



## PlexPCR<sup>®</sup> SARS-CoV-2

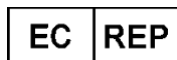
### Multiplex realtime RT-PCR-assay voor de detectie van SARS-CoV-2



Product	Platform	Aantal (reacties)	Catalogusnr.
<i>PlexPCR<sup>®</sup></i> SARS-CoV-2	LC480 II CFX96 <sup>™</sup> Dx CFX96 Touch <sup>™</sup>	384	<b>REF</b> 1301384

#### Accessoireproducten – Analysesoftware

<i>PlexPCR<sup>®</sup></i> SARS-CoV-2 (LC480)	<b>REF</b> 99021
<i>PlexPCR<sup>®</sup></i> SARS-CoV-2 (CFX)	<b>REF</b> 99022



**MedEnvoy**  
Prinses Margrietplantsoen 33 – Suite 123  
2595 AM Den Haag  
Nederland



**SpeedX Pty Ltd**  
Suite 102, National Innovation Centre  
4 Cornwallis Street, Eveleigh  
NSW 2015, Australië  
Tel: +61 2 9209 4170, E-mail: [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au)

#### UITSLUITEND VOOR PROFESSIONEEL GEBRUIK

Niet te koop in de VS

## Inhoud

1	Productbeschrijving.....	4
2	Beoogd gebruik.....	4
3	Informatie over de pathogenen.....	4
4	Inhoud van de kit.....	4
5	Vervoer en opslag.....	5
6	Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.....	5
6.1	Algemeen.....	5
6.2	Laboratorium.....	5
6.3	Het behandelen van monsters.....	5
6.4	Test.....	5
6.5	Veiligheidsmaatregelen.....	5
6.6	Assay plugin waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.....	5
7	Benodigde materialen (niet meegeleverd).....	6
8	Principe van de technologie.....	8
9	Overzicht procedure.....	9
10	Gedetailleerde procedure.....	10
10.1	Monsterafname, transport en opslag.....	10
10.2	Monsterverwerking.....	10
10.2.1	Reagensvolumes voor de MGISP-960.....	10
10.2.2	Reagensvolumes voor de KingFisher Prep en de PurePrep.....	11
10.3	Internal Control (IC) (interne controle [IC]).....	11
10.3.1	Internal Control (interne controle) op de MagNA Pure 96, KingFisher Flex en PurePrep 96.....	11
10.4	Vorbereiding van realtime PCR.....	12
10.4.1	Vorbereiding mastermix.....	12
11	Programmering en analyse.....	12
12	Interpretatie van de resultaten.....	13
13	Beperkingen.....	13
14	Kwaliteitscontrole.....	13
15	Instructies voor de REDx™ FLOQ SARS-CoV-2 Positive Control (positieve controle).....	14
15.1	Gebruiksaanwijzing.....	14
16	Prestatiekenmerken.....	14
16.1	Klinische prestaties.....	14
16.1.1	Klinisch onderzoek 1.....	14
16.2	Analytische prestaties.....	15
16.2.1	Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid.....	15
16.2.2	Analytische gevoeligheid.....	17
16.2.3	Analytische specificiteit.....	20
16.2.4	<i>In silico</i> -analyse.....	21
16.2.5	Inclusiviteit.....	21
16.2.6	Potentieel interfererende substanties.....	21
17	Klantondersteuning en technische ondersteuning.....	21
18	Referenties.....	22
19	Bijlage 1: LightCycler® 480 Instrument II.....	23

19.1	Het LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II) programmeren .....	23
19.2	Het opzetten van een macrosjabloon voor het LightCycler® 480 Instrument II .....	28
19.3	Colour Compensation (kleurcompensatie) voor LightCycler® 480 Instrument II .....	35
19.4	Interpretatie van de resultaten.....	35
20	Bijlage 2: Bio-Rad CFX96™ Dx en CFX96 Touch™ realtime PCR-systeem .....	37
20.4	Het CFX96™ Dx en CFX96 Touch™ realtime PCR-detectiesysteem (CFX96 Dx, CFX96 Touch) programmeren.....	37
20.2	Interpretatie van de resultaten met behulp van de ingebouwde CFX-software.....	40
20.3	Resultaten van de ingebouwde analyse exporteren.....	43
20.4	Interpretatie van de resultaten met de PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX)-analysesoftware .....	45
21	Bijlage A: Interpretatie van de resultaten.....	46
21.1	FastFinder-platform – Minimale IT-vereisten .....	46
21.2	Device set up (instellingen apparaat) (nieuwe gebruiker of nieuw apparaat).....	47
21.2.1	Colour Compensation (Kleurcompensatie).....	47
21.3	Plug-in voor assays (nieuwe gebruiker).....	48
21.4	Monsternaamgeving.....	48
21.5	Mixpartijnummers toevoegen .....	49
21.6	Analyse .....	49
21.7	Resultaten.....	50
21.8	Referentiecurve.....	50
21.9	Overzicht van de resultaten.....	51
21.10	Resultaten exporteren.....	52
22	Woordenlijst .....	53

## 1 Productbeschrijving

De **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-kit is een 1-wells qPCR-multiplex voor de detectie van ernstig acuut respiratoir syndroom coronavirus 2 (SARS-CoV-2). De test geeft 3 aflezingen; Aflezing 1 wijst op de aanwezigheid of afwezigheid van SARS-CoV-2 via detectie van het ORF1ab-gen (Open Reading Frame [open leesframe]); Aflezing 2 wijst op de aanwezigheid of afwezigheid van SARS-CoV-2 via detectie van het RdRp-gen (RNA-dependent RNA polymerase [RNA-afhankelijk RNA-polymerase]); Aflezing 3 is een RNA Internal Control (interne controle) (IC) voor het bewaken van de extractie-efficiëntie en de qPCR-remming. De **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-kit maakt gebruik van **PlexZyme**<sup>®</sup>-technologie voor specificiteit en superieure multiplexmogelijkheden.

Deze assay is gevalideerd op monsters die zijn geëxtraheerd met het MagNA Pure 96 System (Roche), de PurePrep 96 (Molgen) en het KingFisher<sup>™</sup> Flex monsterzuiveringsstelsel (ThermoFisher), vloeistofbehandeling met de **PlexPrep**<sup>™</sup> (SpeedX), en realtime detectie op het LightCycler<sup>®</sup> 480 II Instrument (LC480 II, Roche), het CFX96<sup>™</sup>Dx realtime PCR-detectiesysteem (CFX96 Dx, Bio-Rad), en het CFX96 Touch<sup>™</sup> realtime PCR-detectiesysteem (CFX96 Touch, Bio-Rad).

## 2 Beoogd gebruik

De **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-kit is een *in vitro* diagnostische realtime PCR-test via reverse-transcriptie (RT-qPCR-test) voor de kwalitatieve detectie van SARS-CoV-2.

De **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-kit is bedoeld als hulpmiddel bij de diagnose van SARS-CoV-2 en moet worden gebruikt in combinatie met klinische en andere laboratoriuminformatie.

De **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-kit kan worden gebruikt met de volgende soorten specimen: nasofaryngeale uitstrijkjes.

De **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-kit is bedoeld voor gebruik in een professionele omgeving, zoals in ziekenhuizen, referentie- en overheidslaboratoria. De kit is niet bedoeld voor zelftests, thuisgebruik of point-of-care-gebruik.

De doelgroep van de **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-kit is symptomatische patiënten bij wie de zorgverlener op grond van de klinische presentatie en/of voorgeschiedenis vermoedt dat zij besmet zijn met het ernstig acuut respiratoir syndroom coronavirus (SARS-CoV-2).

## 3 Informatie over de pathogenen

Op 31 december 2019 werd voor het eerst een uitbraak van luchtwegaandoeningen van onbekende etiologie in de stad Wuhan in China aan de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) gerapporteerd.<sup>1</sup> Vervolgens werd een nieuw coronavirus geïdentificeerd en SARS-CoV-2 (ernstig acuut respiratoir syndroom coronavirus 2) genoemd, die de overdraagbare ziekte COVID-19 (coronavirusziekte 2019) veroorzaakt.<sup>2</sup> SARS-CoV-2 heeft sindsdien gezorgd voor een wereldwijde pandemie met meer dan 75 miljoen bevestigde gevallen en meer dan 1,5 miljoen doden per eind september 2020.<sup>3</sup>

## 4 Inhoud van de kit

Aantal tests: 384 reacties

Tabel 1. Inhoud van de kit voor de <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (catalogusnr. 1301384)			
Kleur dop	Inhoud	Beschrijving	Hoeveelheid
Bruin	SARS-CoV-2-mix, 20x	Mix met oligonucleotiden <sup>^</sup> voor amplificatie en detectie van SARS-CoV-2 en Internal control (interne controle) voor LC480 II en CFX	2 x 150 µL
Groen	<b>Plex</b> Mastermix, 2x	Mastermix met de benodigde componenten voor qPCR inclusief dNTP's, MgCl <sub>2</sub> , DNA-polymerase en -buffer	2 x 1,2 mL
Neutraal	RTase, 100x	Reverse transcriptase-enzym voor het genereren van complementair DNA (cDNA) uit RNA-sjabloon	1 x 90 µL
Zwart	RNase Inhibitor (RNase-remmer), 50x	RNase-remmer	1 x 135 µL
Paars	Internal Control (interne controle) RNA <sup>#</sup>	Internal control cells (interne controlecellen) met RNA-matrijs voor interne controle voor het bepalen van de efficiëntie van de extractie, de reverse-transcriptie en de amplificatie	1 x 200 µL
Blauw	Nuclease Free Water (nucleasevrij water)	Water van PCR-kwaliteit	1 x 1 mL

<sup>#</sup> Bewaar buisjes met matrijzen gescheiden van oligomixen, bijvoorbeeld in een ruimte voor het hanteren van matrijzen van nucleïnezuren

<sup>^</sup> Oligonucleotiden zijn PCR-primeparen **PlexZyme**<sup>®</sup>-enzymen en fluorescerende sondes

<sup>\*</sup> Voldoende voor 384 x 10 µL tests. Extra volume geleverd voor compatibiliteit met instrumenten voor vloeistofbehandeling, gevalideerd met **PlexPrep**<sup>™</sup> (SpeedX).

## 5 Vervoer en opslag

- De componenten van de **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-kits worden op droogijs of met bevroren gelpacks verzonden. Alle componenten moeten na ontvangst worden opgeslagen bij een temperatuur tussen -25 °C en -15 °C. Het wordt aanbevolen om het aantal invries-ontdooicycli tot 10 te beperken.
- Als de kit wordt opgeslagen onder de aanbevolen omstandigheden en er op de juiste wijze mee wordt omgegaan, blijft de activiteit van de kit behouden tot de op het etiket vermelde houdbaarheidsdatum. Niet meer gebruiken na de houdbaarheidsdatum.

## 6 Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

### 6.1 Algemeen

- Alleen voor *in vitro* diagnostisch gebruik.
- Lees voor gebruik deze gebruiksaanwijzing zorgvuldig door. Volg de beschreven procedures nauwkeurig om de betrouwbaarheid van de testresultaten te garanderen. Elke afwijking van deze procedures kan de prestaties van de test beïnvloeden.
- Gebruikers moeten voldoende getraind zijn in het gebruik van de **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-test.
- Elk ernstig incident moet worden gemeld aan de fabrikant en de bevoegde autoriteit van de lidstaat waar de gebruiker en/of de patiënt is gevestigd.

### 6.2 Laboratorium

- Het wordt aanbevolen om de monsterbereiding/extractie, de mastermixbereiding, het toevoegen van monsters en de thermocycling in ruimtelijk gescheiden ruimtes uit te voeren. Op zijn minst moet het PCR-apparaat zich in een andere ruimte bevinden dan de ruimten waar de reacties worden voorbereid.
- Het wordt aanbevolen om routinematige laboratoriumvoorzorgsmaatregelen te volgen. Draag geschikte persoonlijke beschermingsmiddelen zoals handschoenen, oogbescherming en een laboratoriumjas bij het hanteren van reagentia.
- In medische monsters kunnen pathogene organismen aanwezig zijn. Behandel alle biologische monsters als mogelijk infectieus en volg de veiligheidsprocedures van uw instituut voor het omgaan met chemische stoffen en biologische monsters.
- Volg de procedures voor het verwijderen van gevaarlijk afval van uw instelling voor de juiste verwijdering van monsters, reagentia en andere mogelijk besmette materialen

### 6.3 Het behandelen van monsters

- Monsters moeten worden verzameld, vervoerd en bewaard met behulp van standaard laboratoriumtechnieken of volgens de instructies van de afnameset.

### 6.4 Test

- Standaard voorzorgsmaatregelen om contaminatie van PCR-reacties te voorkomen zijn onder meer het gebruik van steriele filterpipetpunten; het gebruik van een nieuwe pipetpunt voor elke pipetteerhandeling; en scheiding van de werkstromen.
- PCR-testen zijn gevoelig voor contaminatie door eerdere PCR-producten. Open nooit reageerbuizen nadat de PCR voltooid is.

### 6.5 Veiligheidsmaatregelen

- Veiligheidsinformatiebladen (VIB's) zijn op aanvraag beschikbaar. Neem contact op met [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) voor meer informatie.

### 6.6 Assay plugin waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

- SpeedX-software kan alleen de analyse aansturen van ruwe gegevens die door de testkit worden gegenereerd wanneer deze met het bijbehorende PCR-instrument wordt gebruikt. De bereiding van monsters, de reacties, de programmering van de apparatuur of de uitvoering van de behandeling worden niet hierdoor geregeld.
- Gebruikers moeten goed getraind zijn in het gebruik van de analysesoftware en de toegang moet worden beperkt tot elke toegewezen individuele gebruiker

- Er wordt aanbevolen om controlemechanismen te implementeren voor gebruikersverificatie en cyberveiligheid, zoals antivirussoftware of het gebruik van een firewall binnen het IT-systeem en de door de software gebruikte infrastructuur
- Wanneer een cyberbeveiligingsincident wordt ontdekt, zoals ongeoorloofde toegang en ransomware-aanvallen, moet u contact opnemen met [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) voor verdere ondersteuning.

## 7 Benodigde materialen (niet meegeleverd)

### *Positief controlemonster*

- REDx™ FLOQ SARS-CoV-2 positieve controle uitstrijkje (Microbix, Cat. nr. RED-S-19-01)

### *Algemene verbruiksartikelen voor lab*

- Handschoenen en schone laboratoriumjassen
- Vortexmixer
- Tafelcentrifuge voor buisjes van 0,5 mL en 1,5 mL
- Micropipetten
- Multikanaalspipetten
- Steriele aerosolbestendige pipetpunten
- Buisjes van 0,5 mL en 1,5 mL (PCR-kwaliteit)
- Zelfklevende plaatafdichting
- Buisjes van 2,0 mL (voor voorverdunding van de interne-controlecellen)

### *Voor MagNA Pure 96 Instrument*

- 1x Phosphate Buffered Saline (PBS - 1x met fosfaat gebufferde zoutoplossing)
- MagNA Pure 96 Internal Control Tube (buisje voor interne controle) (Roche, catalogusnr. 00374905001)
- MagNA Pure 96 DNA en Viral NA Small Volume Kit (Roche, catalogusnr. 06543588001)
- MagNA Pure 96 System Fluid (external) (vloeistof voor externe controle) (Roche, catalogusnr. 06640729001)
- MagNA Pure 96 Processing Cartridge (verwerkingspatroon) (Roche, catalogusnr. 06241603001)
- MagNA Pure 96 Pure tip 1000uL (Zuivere tip 1000uL) (Roche, catalogusnr. 6241620001)
- MagNA Pure 96 Resultatenplaat (Roche, catalogusnr. 06241611001)
- MagNA Pure Sealing Foil (Zuivere afdichtfolie) (Roche, Catalogusnr. 06241638001)

### *Voor MGISP-960-instrument*

- Nucleïnezuurextractiekit 96 prep (MGI, Cat. Nr. 1000022201(ARTG-IVD)) of Nucleïnezuurextractiekit 96 prep (MGI, Cat. Nr.1000021042 (CE-IVD))
- 4 x 250 µL automatische filtertips (MGI, Cat Nr. 1000000723)
- 5 x 1.3 mL deep-well plaat met u-vormige onderkant (MGI, Cat. Nr. 1000004644)
- 1 x omrande 96-well PCR-plaat met harde shell en dunne wand, witte shell/doorzichtige well (MGI, Cat. Nr. 1000012059)
- 50 mL-buis, DNase-vrij, RNase-vrij
- Absoluut ethanol (100%)
- Plaatcentrifuge

### *Voor het PurePrep 96-instrument*

- 1x Phosphate Buffered Saline (PBS) (met fosfaat gebufferde zoutoplossing [PBS])
- Water voor moleculaire toepassingen
- PurePrep diepe wells-plaat 2 mL (Molgen catalogusnr. MG96020050)
- PurePrep 96-elutieplaat 200 ul (Molgen catalogusnr. MG96010050)
- PurePrep 96-tipcombs (Molgen catalogusnr. MG96030050)
- Molgen PurePrep pathogenen 1x96-kit (Molgen catalogusnr. OE00290096) OF 10x96-kit (Molgen catalogusnr. OE00290960)

- Microtiterplaat-schudder (minimale snelheid 1000 RPM)
- 50 mL-reagensreservoirs voor 8-kanaalspipetten
- 50 mL Falcon-buizen

#### *Voor de KingFisher Flex*

- 1x Phosphate Buffered Saline (PBS - 1x met fosfaat gebufferde zoutoplossing)
- Thermofisher MagMAX viraal en pathogeen nucleïnezuurisolatie-kit (Thermofisher catalogusnr. A42352)
- KingFisher 96 diepe wells-plaat, v-bodem, polypropyleen (Thermofisher catalogusnr. 95040450)
- KingFisher 96-tipcombs voor diepe wells-magneten (Thermofisher catalogusnr. 97002534)
- KingFisher 96-microtiterplaat (200 µL) (Thermofisher catalogusnr. 97002540)
- 80% ethanol
- 50 mL-reagensreservoirs voor 8-kanaalspipetten
- 50 mL Falcon-buizen

#### *Voor SpeedX PlexPrep™ instrument voor vloeistofbehandeling*

- **PlexPrep™** dek met 8 posities uitgerust met 2 onafhankelijke kanalen en een 8-sondekop (onderdeel nr. 6600200-01)
- 4x tiprekmodules met frame (catalogusnr. HMT-6600533-01)
- 4x buisjesmodule met 24 posities (catalogusnr. HMT-6600555-01)
- 1x module voor kleine buisjes met 24 posities (catalogusnr. HMT6600409-01)
- 50ul geleidende filtertips (catalogusnr. HMT-235948)
- 300ul geleidende filtertips (catalogusnr. HMT-235903)
- 1000 ul geleidende filtertips (catalogusnr. HMT-235905)

#### *Voor LightCycler® 480 Instrument II*

- **PlexPCR®** Colour Compensation (CC) kit (kleurcompensatiekit) (SpeedX, catalogusnr. 90001)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (96-wells plaat) (Roche, catalogusnr. 04729692001)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 (384-wells plaat) (Roche, catalogusnr. 04729749001)
- LightCycler® 480 Sealing Foil (afdichtfolie) (Roche, catalogusnr. 04729757001)

#### *Voor CFX96™ Dx realtime PCR-detectiesysteem en CFX96 Touch™ realtime PCR-detectiesystemen*

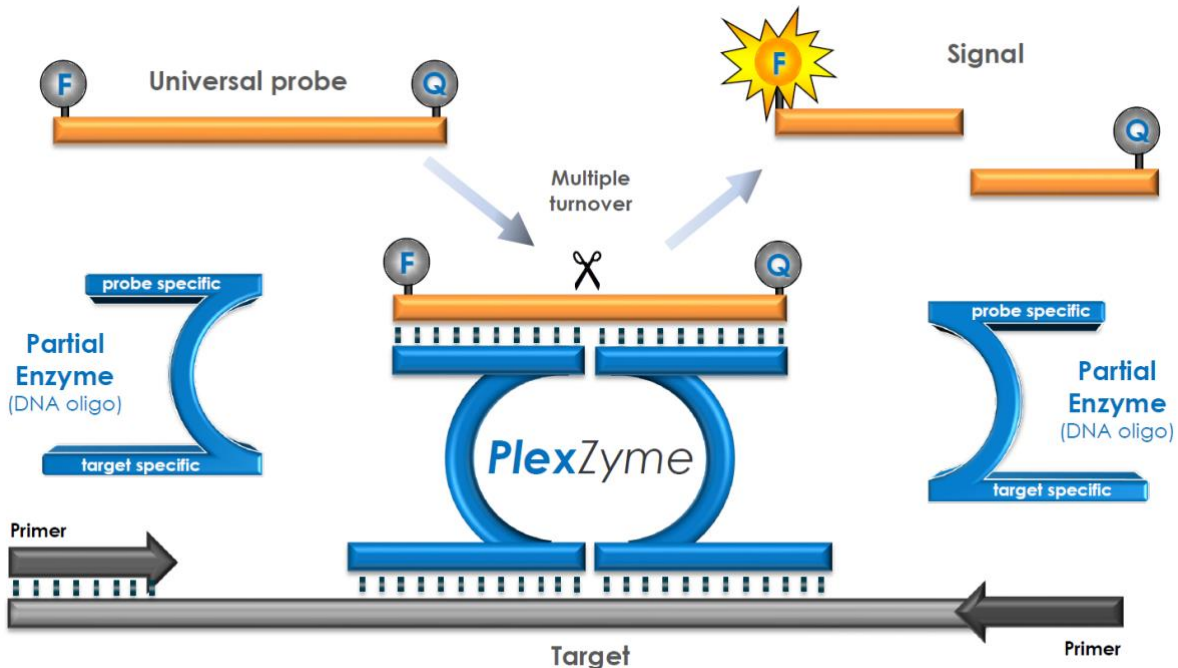
- Hard-Shell® 96-Well PCR Plates (96-wells-platen), laag profiel, half omrand, doorzichtig shell/doorzichtig wells (Bio-Rad, catalogusnr. HSL9901 or HSL9601)
- Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film (afdichtfilm), zelfklevend, optisch (Bio-Rad, catalogusnr. MSB1001)

## 8 Principe van de technologie

Realtime-PCR (qPCR) kan worden gebruikt voor de amplificatie en detectie van specifieke doel-nucleïnezuren van pathogenen. **PlexPCR**<sup>®</sup> is een qPCR-technologie waarbij gebruik wordt gemaakt van **PlexZyme**<sup>®</sup>-enzymen die het geamplificeerde product detecteren en melden door het genereren van een fluorescentiesignaal (**Afbeelding 1**).

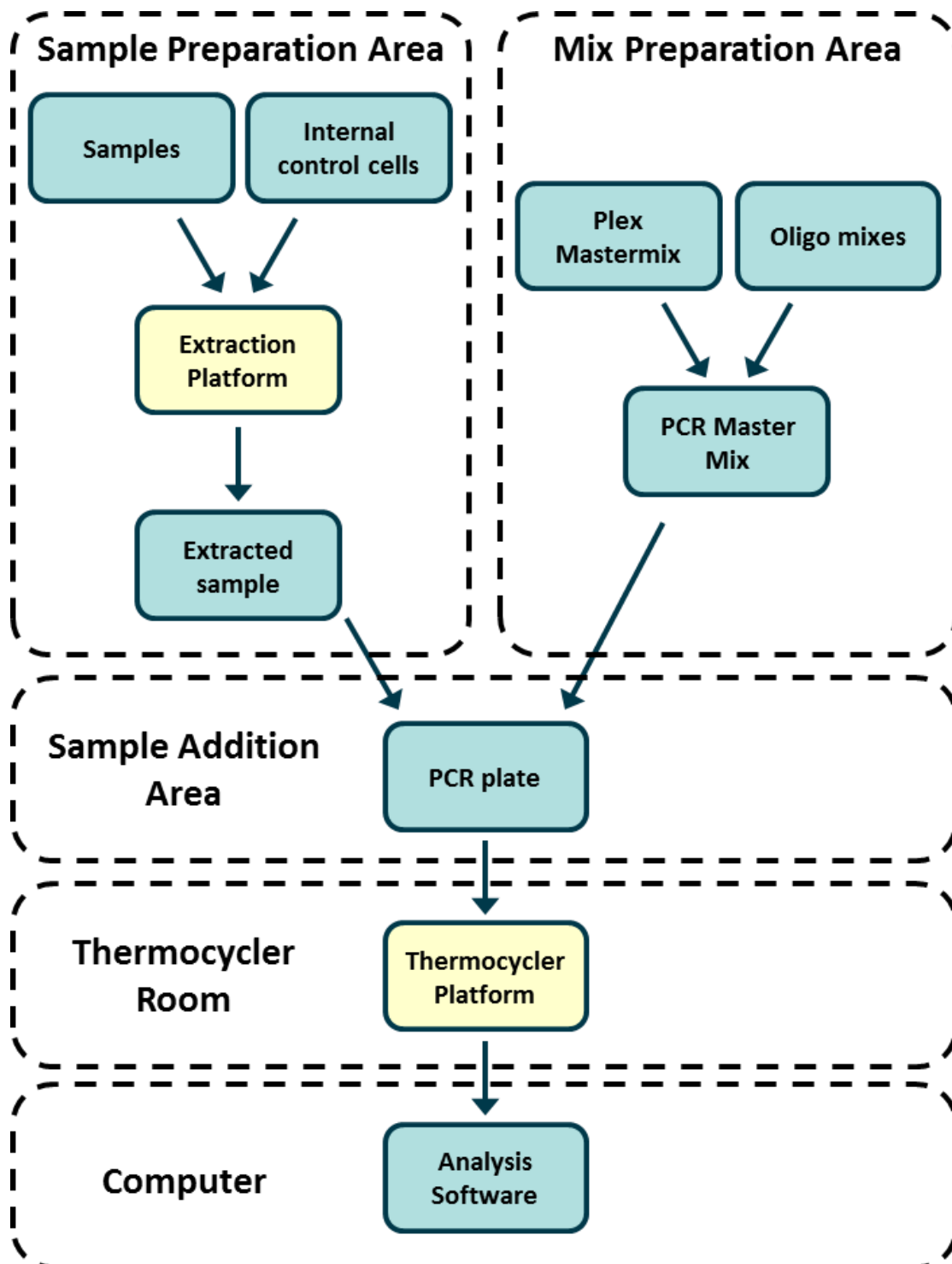
**PlexZyme**<sup>®</sup>-enzymen zijn katalytische DNA-complexen die bestaan uit twee DNA-oligo's die 'partiële enzymen' worden genoemd. Elk partieel enzym heeft een doelspecifiek gebied, een katalytische kern en een gebied dat aan een universele probe bindt. Als het doelproduct aanwezig is, binden de twee partiële enzymen naast elkaar en vormen zo het actieve **PlexZyme**<sup>®</sup> dat de katalytische activiteit bezit om een gelabelde sonde te splitsen. Door deze splitsing worden de fluorofoor- en quencherkleurstof van elkaar gescheiden, waardoor een fluorescentiesignaal wordt geproduceerd dat realtime kan worden gevolgd. **PlexZyme**<sup>®</sup>-enzymen hebben in vergelijking met andere detectietechnologieën extra specificiteit, omdat er binding van twee partiële enzymen nodig is voor detectie. Bovendien zijn **PlexZyme**<sup>®</sup>-enzymen 'multiple-turnover'-enzymen, zodat in elke PCR-cyclus meerdere sondes kunnen worden gesplitst, wat tot een sterk en gevoelig signaal leidt. **PlexZyme**<sup>®</sup>-assays zijn zeer gevoelig en specifiek en uitermate geschikt voor multiplexdetectie van pathogenen.

Afbeelding 1. Schematische voorstelling van **PlexZyme**<sup>®</sup>-detectie en universele signalering





9 Overzicht procedure



## 10 Gedetailleerde procedure

**NB:** Geleverde reagentia zijn cursief weergegeven, met daarachter tussen haakjes de kleur van de deksel van het buisje.

### 10.1 Monsterafname, transport en opslag

Het niet correct verzamelen, opslaan en transporten van monsters zal waarschijnlijk resulteren in onjuiste testresultaten. Een goede training in het verzamelen van monsters wordt sterk aangeraden, om de kwaliteit en stabiliteit van de monsters te garanderen.

Raadpleeg de gebruikersinstructies van de producent voor het correct verzamelen van monsters.

Voorafgaand aan het gebruik van elke verzamelmethode dienen getrainde medewerkers het hulpmiddel voor monsterverzameling en de methodologie goed te begrijpen. Raadpleeg ten minste de testbeschrijving voor het volgende: aanduiding van het monstertype, voldoende volume, procedure(s), benodigde verzamelmateriaal, voorbereiding patiënt, en het juist hanteren en bewaren van monsters.

Nasofaryngeale uitstrijkjes moeten volgens de instructies van de verzamelkit worden verzameld en vervoerd. Het wordt aanbevolen om de monsters van nasofaryngeale uitstrijkjes onmiddellijk na ontvangst te testen of op te slaan bij een temperatuur tussen -25 °C en -15 °C en het aantal invries-ontdooicycli tijdens gebruik tot 3 te beperken.

### 10.2 Monsterverwerking

De *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2-kit is gevalideerd op de extractie-instrumenten die worden vermeld in **Tabel 2**.

Zie **paragraaf 10.3** voor instructies over het gebruik van de Internal Control (interne controle).

Zie **paragraaf 15** voor instructies over het gebruik van de REDx<sup>™</sup> FLOQ SARS-CoV-2 Swab Positive Control-kit (positieve controle uitstrijkje).

Tabel 2. Gevalideerde extractieprotocollen				
Instrument	Extractiekit	Monstervolume	Protocol	Elutievolume
MagNA Pure 96 <sup>a,b</sup>	MagNA Pure 96 DNA en Viral NA Small Volume Kit	200 µL	Pathogen Universal 200	50 µL
MGISP-960 <sup>a,b</sup>	Nucleïnezuurextractiekit	180 µL	MGISP-960 Geautomatiseerde Extractie Standaard Workflow	30 µL
KingFisher Flex <sup>a,b</sup>	MagMAX viraal/pathogeen nucleïnezuurisolatie-kit	200 µL	MVP_Flex_200ul	50 µL
PurePrep 96 <sup>a,b</sup>	PurePrep pathogenen-kit	200 µL	PP v.3	50 µL

<sup>a</sup> Zie **10.3.1** voor instructies voor het gebruik van de internal control (interne controle) op de MagNA Pure 96, KingFisher Flex en PurePrep 96

<sup>b</sup> Monsters moeten binnen 30 minuten na extractie aan de mastermix worden toegevoegd

#### 10.2.1 Reagensvolumes voor de MGISP-960

Tabel 3. MGISP-960 reagensvolumes per sample		
Reagens	Volume per monster	Plaat
Buffer MLB	160µL	Deep-well plaat met u-vormige bodem (voorbereid buffermengsel)
Absoluut ethanol*	200µL	Deep-well plaat met u-vormige bodem (voorbereid buffermengsel)
Magnetische kralen M	15µL	Deep-well plaat met u-vormige bodem (voorbereid buffermengsel)
Bufferversterker	1µL	Deep-well plaat met u-vormige bodem (voorbereid buffermengsel)
RNase-vrij water	15µL	Deep-well plaat met u-vormige bodem (voorbereid buffermengsel)
RNase-vrij water	50µL	Deep-well plaat met u-vormige bodem
Buffer MW1	170µL	Deep-well plaat met u-vormige bodem
Buffer MW2	340µL	Deep-well plaat met u-vormige bodem

\* Niet meegeleverd

### 10.2.2 Reagensvolumes voor de KingFisher Prep en de PurePrep

Tabel 4. KingFisher reagensvolumes		
Reagens	Volume per monster	Plaat
MagMax bindende oplossing	265 µL	KingFisher 96 diepe wells-plaat (monsterplaat)
MagMax Total nucleïnezuurbindende korrels	10 µL	KingFisher 96 diepe wells-plaat (monsterplaat)
MagMax Proteinase K	5 µL	KingFisher 96 diepe wells-plaat (monsterplaat)
MagMax wasbuffer	500 µL	KingFisher 96 diepe wells-plaat
Spoeling 2* (80% ethanol)	500 µL	KingFisher 96 diepe wells-plaat
Spoeling 3* (80% ethanol)	250 µL	KingFisher 96 diepe wells-plaat
MagMax elutie-oplossing	50 µL	KingFisher 96-microtiterplaat 200 µL

\* niet bijgeleverd

Tabel 5. PurePrep 96 reagensvolumes		
Reagens	Volume per monster	Plaat
Molgen Lysis-buffer PA1	200 µL	PurePrep diepe wells-plaat 2 mL (monsterplaat)
Molgen Poly-A-RNA 2,5 mg/mL-oplossing	1 µL	PurePrep diepe wells-plaat 2 mL (monsterplaat)
Molgen Proteinase K 20 mg/mL-oplossing	10 µL	PurePrep diepe wells-plaat 2 mL (monsterplaat)
Molgen MagSi-PA VII (magnetische korrels)	20 µL	PurePrep diepe wells-plaat 2 mL (monsterplaat)
Molgen bindende buffer U1	400 µL	PurePrep diepe wells-plaat 2 mL (monsterplaat)
Molgen wasbuffer I	800 µL	PurePrep diepe wells-plaat 2 mL
Molgen wasbuffer I	800 µL	PurePrep diepe wells-plaat 2 mL
Molgen wasbuffer II	800 µL	PurePrep diepe wells-plaat 2 mL
Molgen elutiebuffer	50 µL	PurePrep 96-elutieplaat 200 µl

### 10.3 Internal Control (IC) (interne controle [IC])

De kit bevat een interne controle om de extractie-efficiëntie en qPCR-remming te bepalen. De internal control assay (interne controle-assay) wordt meegeleverd met de assay-mix en versterkt de *Internal Control RNA* (interne controle-RNA) (**PAARS**). De *Internal Control RNA* (interne controle-RNA) wordt verdund en verwerkt zoals hieronder beschreven voor specifieke extractie-instrumenten. De matrijs voor internal control (interne controle) wordt dus met het monster meegeëxtraheerd en in de reactie meegeamplificeerd.

#### 10.3.1 Internal Control (interne controle) op de MagNA Pure 96, KingFisher Flex en PurePrep 96

Verdun de *Internal Control RNA* (interne controle-RNA) (**PAARS**) 1 op 100 in 1x PBS (**Tabel 6**). Pas het volume zo nodig aan en houd daarbij dezelfde verdunningsfactor aan (zie de handleiding van de extractiekit voor het minimale volume voor het vereiste aantal monsters). De verdunde interne controlecellen worden in het Internal Control RNA (interne controle-RNA) in de MagNA Pure 96 geladen en er wordt automatisch 20 µL aan elk monster toegevoegd (standaard). Voor extracties op de PurePrep 96 en KingFisher moet 20 µl van het verdunde internal control RNA (interne controle RNA) handmatig aan de monsterplaat worden toegevoegd.

**NB:** Verdunde Internal Control RNA (interne controle-RNA) NIET bewaren

Tabel 6. Verdunning van Internal Control cells (interne controlecellen) voor MagNA Pure 96 (verdunning 1:100)			
Internal Control RNA (interne controle-RNA) (PAARS) (µL)	1x PBS (µL)	Totaal volume (µL)	Volume toegevoegd aan monster (µL)
36	3564	3600	20

#### 10.4 Voorbereiding van realtime PCR

**NB:** Alvorens de reagentia te gebruiken, dient u deze volledig te ontgooien en gedurende korte tijd goed te mengen in de vortexmixer.

De **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-kit is getest op een eindreactievolumen van 10 µL in platen met 96 of 384 wells op de LC480 II; op een eindreactievolumen van 10 µL in platen met 96 wells op de CFX96 Dx en CFX96 Touch. De **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-kit heeft een geschikt dood volume voor gebruik met systemen voor vloeistofbehandeling en is gevalideerd met de SpeedX **PlexPrep**<sup>™</sup>. Neem voor hulp met protocollen contact op via [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Raadpleeg **Tabel 1** - voor een beschrijving van de inhoud van de kit.

##### 10.4.1 Voorbereiding mastermix

- Voor een reactievolumen van 10 µL is 7,5 µL mastermix en 2,5 µL extract nodig. Bereid de mastermix zoals aangegeven in **Tabel 7**. Pipetteer de mastermix in de PCR-plaat en voeg vervolgens geëxtraheerd monster aan de reactie toe.
- Op elke plaat moeten positieve en negatieve controles worden uitgevoerd.
- Dicht de plaat af, centrifugeer en breng over naar de thermocycler.

Tabel 7. Mastermix		
Reagens	Concentratie	Volume per 10 µL reactie (µL)
Nuclease Free Water (nucleasevrij water) (BLAUW)	n.v.t.	1,7
<b>Plex</b> Mastermix (GROEN)	2x	5,0
SARS-CoV-2-mix (BRUIN)	20x	0,5
RTase (NEUTRAAL)	100x	0,1
RNase-remmer (BLACK)	50x	0,2
Totaal volume (µL)		7,5
Voeg 2,5 µL monster toe zodat het eindvolume op 10 µL komt		

## 11 Programmering en analyse

Details voor programmering en analyse zijn beschreven in **paragraaf 19-21**.

De **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-kit gebruikt 3 kanalen voor detectie van SARS-CoV-2 via detectie van de genen ORF1ab (Open Reading Frame [open leesframe]) en RdRp (RNA-dependent RNA polymerase [RNA-afhankelijk RNA-polymerase]) en Internal Control (interne controle) (**Tabel 8**).

Tabel 8. Kanalen voor <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2-targets			
qPCR-instrument	ORF1ab	RdRp-gen	Internal Control (interne controle)
LC480 II	465-510	533-580	533-610
CFX96 Dx en CFX96 Touch	FAM	HEX	Texas Red

## 12 Interpretatie van de resultaten

Gegevensinterpretatie kan worden uitgevoerd met behulp van de ingebouwde LC480 II-software, de ingebouwde CFX96™ Dx- en CFX96™ Touch-software of de **PlexPCR**® SARS-CoV-2-analysesoftware. De **PlexPCR**® SARS-CoV-2-analysesoftware automatiseert de gegevensinterpretatie van de amplificatieresultaten en stroomlijnt de workflow. Instructies voor het gebruik van de analysesoftware vindt u in **paragraaf 21**.

Zie **Tabel 9** voor de juiste analysesoftware voor elk instrument voor realtime PCR. De analysesoftware is op aanvraag leverbaar. Neem voor meer informatie contact op via [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Tabel 9. <b>PlexPCR</b> ® SARS-CoV-2-analysesoftware		
Catalogusnr.	Analysesoftware*	Instrument voor realtime PCR
99021	<b>PlexPCR</b> ® SARS-CoV-2 (LC480)	LC480 II
99022	<b>PlexPCR</b> ® SARS-CoV-2 (CFX)	CFX96 Dx en CFX96 Touch

\* Raadpleeg de website <https://plexpcr.com/products/respiratory-infections/plexpcr-sars-cov-2/> om na te gaan of u de nieuwste versie van de analysesoftware gebruikt.

## 13 Beperkingen

- De **PlexPCR**® SARS-CoV-2-assay dient uitsluitend te worden uitgevoerd door personeel dat opgeleid is voor de procedure en deze moet worden uitgevoerd overeenkomstig de gebruiksaanwijzing.
- Betrouwbare resultaten zijn afhankelijk van afdoende verzameling, vervoer, opslag en verwerking van de specimen. Het niet volgen van de juiste procedures in een van deze stappen kan tot onjuiste resultaten leiden.
- De **PlexPCR**® SARS-CoV-2-assay is een kwalitatieve assay en levert GEEN kwantitatieve waarden of informatie over de hoeveelheid organismen.
- Resultaten van de test moeten gecorreleerd worden met de klinische geschiedenis, epidemiologische gegevens, laboratoriumgegevens en alle andere gegevens waarover de arts beschikt.
- De prevalentie van virale targets zal de positieve en negatieve voorspellende waarden voor de assay beïnvloeden.
- Negatieve resultaten sluiten de mogelijkheid van infectie als gevolg van de onjuiste verzameling van monsters, technische fouten, de aanwezigheid van inhibitoren, dooreenhalen van specimen, of kleine aantallen organismen in het klinische specimen niet uit.
- Onjuiste positieve resultaten kunnen optreden als gevolg van kruisbesmetting door doelorganismen, hun nucleïnezuuren of een versterkt product.

Klinische monsters met een Cq-waarde < 3 geven mogelijk geen geldig resultaat. Deze monsters worden door de **PlexPCR**® SARS-CoV-2-analysesoftware gemarkeerd met het volgende bericht: "Error: Abnormal change in fluorescence level" (Fout: abnormale wijziging in het fluorescentieniveau). Dit wijst op een SARS-CoV-2-monster met een hoge virale load boven de detectielimiet. Dergelijke monsters moeten worden verdund en opnieuw worden uitgevoerd.

Deze monsters worden ook bij analyse met de ingebouwde LC480 II-software gemarkeerd met het volgende bericht: "Some samples exceed the noiseband value in the background calculation region" (Sommige monsters overschrijden de geluidsbandwaarde in het achtergrondberekeningsgebied). Dit wijst op een SARS-CoV-2-monster met een hoge virale load boven de detectielimiet. Dergelijke monsters moeten worden verdund en opnieuw worden uitgevoerd.

Klinische monsters kunnen ongeldig lijken als ze een hoge virale load hebben. Dit wordt niet gesignaleerd door de ingebouwde CFX-software, en daarom moet de gebruiker alle curven controleren alvorens verder te gaan. Wanneer een SARS-CoV-2-monster met hoge load de detectielimiet overschrijdt, moeten de monsters worden verdund en opnieuw worden uitgevoerd.

## 14 Kwaliteitscontrole

De **PlexPCR**® SARS-CoV-2-kit bevat een internal control (interne controle) om de extractie-efficiëntie en qPCR-remming te bepalen (**paragraaf 10.3**).

De REDx™ FLOQ SARS-CoV-2 Swab Positive Control (positieve controle uitstrijkje) (Microbix, catalogusnr. RED-S-19-01) wordt aangeraden als positief controlemateriaal voor nucleïnezuuramplificatie. Zie **paragraaf 15** voor instructies over het gebruik van de REDx™ FLOQ SARS-CoV-2 Swab Positive Control (positieve controle uitstrijkje). Aanbevolen wordt om een bekend negatief specimen als negatieve controle te gebruiken.

## 15 Instructies voor de REDx™ FLOQ SARS-CoV-2 Positive Control (positieve controle)

De REDx™ FLOQ SARS-CoV-2 Swab Positive Control (positieve controle uitstrijkje) (Microbix, catalogusnr. RED-S-19-01) bevat positief controlemateriaal voor SARS-CoV-2.

De REDx™ SARS-CoV-2 Positive Controls (positieve controles) moeten bij 2-8 °C worden opgeslagen tot aan gebruik. Eenmaal geopend kan de REDx™ SARS-CoV-2 Positive Control (positieve controle) niet nog eens worden gebruikt.

Zie de bijsluiter van de REDx™ SARS-CoV-2 Positive Control (positieve controle) voor meer informatie over opslag en beperkingen.

### 15.1 Gebruiksaanwijzing

Verdun de REDx™ SARS-CoV-2 Positive Control (positieve controle) in 3 mL universeel transportmedium (UTM) of viraal transportmedium (VTM).

Bereid qPCR-reacties voor zoals beschreven in **paragraaf 10.4** met positief controlemateriaal als monster.

## 16 Prestatiekenmerken

### 16.1 Klinische prestaties

#### 16.1.1 Klinisch onderzoek 1

Een retrospectief klinisch onderzoek werd uitgevoerd in het Queensland Paediatric Infectious Diseases Laboratory (QPID), South Brisbane, QLD, Australië, op gearchiveerde monsters van nasofaryngeale uitstrijkjes (n=165) die eerder zijn getest met de Abbott m2000 SARS-CoV-2-assay. Monsters werden geëxtraheerd op het extractieplatform van de MagNA Pure 96 (Roche) met het Pathogen Universal 200-protocol. Er werd 200 µL aan monsters geëxtraheerd en deze werden geëluëerd in 50 µL. Monsters werden getest met de **PlexPCR®** SARS-CoV-2-kit in 10 µL reacties op de LightCycler 480 II.

Er werd gebruikt gemaakt van een samengesteld referentieresultaat als referentiemethode voor de **PlexPCR®** SARS-CoV-2-assay. De resultaten van twee gevalideerde SARS-CoV-2 PCR-assays (Abbott m2000 SARS-CoV-2-assay en Real-time fluorescent RT-PCR-kit voor de detectie van SARS-CoV-2 (BGI)) werden geanalyseerd. Monsters waarvoor in beide assays overeenstemmende resultaten werden gegenereerd, werden positief of negatief bevonden voor SARS-CoV-2. De SARS-CoV-2-status van monsters waarvoor geen overeenstemmend resultaat werd gegenereerd tussen de twee vergelijkende assays (n=22) kon niet met zekerheid worden vastgesteld en deze monsters werden uitgesloten van de uiteindelijke analyse. Positieve en negatieve overeenkomstpercentages tussen de **PlexPCR®** SARS-CoV-2 en de samengestelde referentie worden weergegeven in **Tabel 10**.

Tabel 10. Klinische evaluatie van de <b>PlexPCR®</b> SARS-CoV-2-kit			
		Resultaat samengestelde referentie (n = 142)	
		SARS-CoV-2	
		Positief	Negatief
<b>PlexPCR® SARS-CoV-2<sup>1</sup></b>	Positief	83	2
	Negatief	6	51
<b>Positief overeenkomstpercentage (PPA)</b>		93,26% (95% CI 85,90 – 97,49%)	
<b>Negatief overeenkomstpercentage (NPA)</b>		96,23% (95% CI 87,02 – 99,54%)	
<b>Algehele overeenkomstgraad (ORA)</b>		94,37% (95% CI 89,20 – 97,54%)	

<sup>1</sup>Eén monster was herhaaldelijk ongeldig in de **PlexPCR®** SARS-CoV-2-assay en kon niet worden beoordeeld.

## 16.2 Analytische prestaties

### 16.2.1 Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid

#### 16.2.1.1 LightCycler® 480 Instrument II

Een onderzoek naar reproduceerbaarheid is uitgevoerd over partijen, operators, dagen en LightCycler® 480 II instrumenten voor de **PlexPCR**® SARS-CoV-2-assay, met panelen geprepareerd in gebundelde negatieve klinische nasofaryngeale uitstrijkjes verzameld in een viraal transportmedium (VTM). Paneelleden bestonden uit het referentiemateriaal SARS-CoV-2-stam USA-WA1/2020 (ZeptoMetrix, NATtrol™ SARS-CoV-2 Stock, catalogusnr. NATSARS(COV2)-ST) verrijkt in negatieve nasofaryngeale uitstrijkjes verzameld in VTM bij 5x LOD, 50x LOD en 100x LOD. Elk paneel bevatte zes replicaten van deze paneelleden.

De tests werden uitgevoerd met twee verschillende partijen **PlexPCR**® SARS-CoV-2-mix. Panelen werden tweemaal per dag getest over drie niet-openvolgende dagen door twee operators, wat een totaal opleverde van 36 waarnemingen per paneellid (6 replicaten x 2 runs x 3 dagen x 1 locatie = 36 waarnemingen).

De herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid tussen partijen, dagen, instrumenten en operators werd beoordeeld. Voor elk paneellid werd het overeenkomstpercentage berekend, gebaseerd op het verwachte resultaat in het SARS-CoV-2-detectiecomponent van de assay. Het variatiecoëfficiëntpercentage (%CV) werd berekend op basis van de cycluskwantificeringswaarde ( $C_q$ ) die werd gerapporteerd voor SARS-CoV-2-detectie. De resultaten van de testen voor herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid worden getoond in **Tabel 11**.

**Tabel 11. Herhaalbaarheid/reproduceerbaarheid van het SARS-CoV-2-detectiecomponent van de PlexPCR® SARS-CoV-2-assay op het LightCycler® 480 Instrument II**

SARS-CoV-2 – ORF1ab										
			Binnen de run		Tussen runs		Tussen partijen		Totaal	
Paneellid	N	Gemiddel de C <sub>q</sub>	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
100x LOD	36	18,6	0,52	2,8	0,31	1,7	0,51	2,7	0,5	2,7
50x LOD	36	19,4	0,53	2,7	0,28	1,5	0,58	3	0,52	2,7
5x LOD	36	22,6	0,91	4	0,53	2,3	0,84	3,7	0,98	4,3
SARS-CoV-2 – RdRp										
			Binnen de run		Tussen runs		Tussen partijen		Totaal	
Monster-ID	N	Gemiddel de C <sub>q</sub>	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
100x LOD	36	19,1	0,4	2,1	0,24	1,3	0,31	1,6	0,36	1,9
50x LOD	36	19,9	0,41	2,1	0,19	1	0,36	1,8	0,36	1,8
5x LOD	36	23,2	0,51	2,2	0,31	1,3	0,39	1,7	0,57	2,5
Internal Control (interne controle)										
			Binnen de run		Tussen runs		Tussen partijen		Totaal	
Monster-ID	N	Gemiddel de C <sub>q</sub>	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
100x LOD	36	19,3	0,36	1,9	0,45	2,3	0,3	1,6	0,51	2,6
50x LOD	36	19,5	0,42	2,2	0,41	2,1	0,4	1,8	0,52	2,7
5x LOD	36	19,5	0,67	3,4	0,54	2,7	0,5	2,2	0,69	3,4
Negatief	36	20,4	0,35	1,7	0,93	4,6	0,2	0,8	0,89	4,4

#### 16.2.1.2 CFX96™ Dx realtime PCR-detectie en CFX96 Touch™ realtime PCR-detectiesystemen

Een onderzoek naar herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid is uitgevoerd over partijen, operators, dagen en runs op de CFX96™ Touch realtime PCR-detectiesystemen voor de PlexPCR® SARS-CoV-2-assay, met panelen geprepareerd in gebundelde negatieve klinische nasofaryngeale uitstrijkjes verzameld in een viraal transportmedium (VTM). Paneelleden bestonden uit het referentiemateriaal SARS-CoV-2-stam USA-WA1/2020 (ZeptoMetrix, NATtrol™ SARS-CoV-2 Stock, catalogusnr. NATSARS(COV2)-ST) verrijkt in negatieve nasofaryngeale uitstrijkjes verzameld in VTM bij 5x LOD, 50x LOD en 100x LOD. Elk paneel bevatte zes replicaten van deze paneelleden.

De tests werden uitgevoerd met twee verschillende partijen PlexPCR® SARS-CoV-2-mix. Panelen werden driemaal per dag getest over drie niet-openvolgende dagen door twee operators, wat een totaal opleverde van 108 waarnemingen per paneellid.

De reproduceerbaarheid binnen de runs, tussen runs, tussen partijen, tussen operators, tussen instrumenten en de algehele reproduceerbaarheid werd beoordeeld. Voor elk paneellid werd het overeenkomstpercentage berekend, gebaseerd op het verwachte resultaat in het SARS-CoV-2-detectiecomponent van de assay. Het variatiecoëfficiëntpercentage (%CV) werd berekend op basis van de cycluskwantificeringswaarde (C<sub>q</sub>) die werd gerapporteerd voor SARS-CoV-2-detectie. De resultaten van de testen voor herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid worden getoond in **Tabel 12**.



**Tabel 12. Herhaalbaarheid/reproduceerbaarheid van het SARS-CoV-2-detectiecomponent van de PlexPCR® SARS-CoV-2-assay op het CFX96 Touch™ realtime PCR-detectiesysteem**

SARS-CoV-2 – ORF1ab														
			Binnen de run		Tussen runs		Tussen partijen		Tussen operators		Tussen instrumenten		Totaal	
Paneellid	N	Gemiddelde C <sub>q</sub>	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
100x LOD	108	19,18	0,27	1,5	0,41	2,2	0,65	3,4	0,85	4,4	0,17	0,9	1,14	5,9
50x LOD	108	20,20	0,05	0,2	0,42	2,1	0,67	3,3	0,82	4,0	0,13	0,6	1,18	5,9
5x LOD	108	22,78	0,37	1,7	0,45	2,0	0,41	1,8	0,72	3,2	0,28	1,2	1,19	5,2
SARS-CoV-2 – RdRp														
			Binnen de run		Tussen runs		Tussen partijen		Tussen operators		Tussen instrumenten		Totaal	
Monster-ID	N	Gemiddelde C <sub>q</sub>	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
100x LOD	108	19,80	0,12	0,6	0,35	1,8	0,63	3,2	0,85	4,3	0,16	0,8	1,15	5,8
50x LOD	108	20,73	0,22	1,1	0,22	1,1	0,67	3,2	0,85	4,1	0,18	0,9	1,23	5,9
5x LOD	108	23,18	0,39	1,7	0,24	1,0	0,53	2,3	0,61	2,6	0,07	0,3	1,09	4,7
Internal Control (interne controle)														
			Binnen de run		Tussen runs		Tussen partijen		Tussen operators		Tussen instrumenten		Totaal	
Monster-ID	N	Gemiddelde C <sub>q</sub>	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
100x LOD	108	20,34	0,24	1,2	0,51	2,5	0,28	1,4	0,23	1,1	0,06	0,3	0,79	3,9
50x LOD	108	20,75	0,29	1,4	0,75	3,6	0,20	0,9	0,18	0,9	0,01	0,0	0,74	3,6
5x LOD	108	20,98	0,26	1,2	0,76	3,6	0,11	0,5	0,12	0,6	0,05	0,2	0,69	3,3
Negatief	108	21,32	0,22	1,0	0,80	3,7	0,10	0,4	0,14	0,6	0,04	0,2	1,01	4,8

### 16.2.2 Analytische gevoeligheid

#### 16.2.2.1 LightCycler® 480 Instrument II

SARS-CoV-2-stam USA-WA1/2020 (ZeptoMetrix, NATrol™ SARS-CoV-2 Stock, catalogusnr. NATSARS(COV2)-ST) werd gebruikt als de representatieve stam voor het beoordelen van de detectielimiet (LoD [limit-of-detection]) van de PlexPCR® SARS-CoV-2-assay op het LightCycler® 480 Instrument II. Gekwantificeerde preparaten met positief referentiemateriaal van SARS-CoV-2 werden serieel verdund in negatieve nasofaryngeale uitstrijkjes in VTM. In totaal werden er 7 concentratieniveaus getest op meerdere dagen met gebruik van 2 onafhankelijke partijen van PlexPCR® SARS-CoV-2-assay-reagentia voor een totaal van 40 replicaten per concentratie. De LoD werd door middel van de logistische regressie-analyse (Probit-model) bepaald als de laagste concentratie (uitgedrukt in exemplaren/mL) waarmee een minimum van ≥ 95% positieve replicaten werd gegenereerd.

De LoD-waarde (vastgesteld uit de gegevens weergegeven in Tabel 13) was 764 exemplaren/mL (95% CI: 565,69 – 1193,50 exemplaren/mL).

Tabel 13. LoD van de *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2-assay<sup>†</sup>

Positief referentiemateriaal	Stam	SARS-CoV-2 concn. (genomen per mL)	<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2-resultaat		
			Positief	Totaal	% positief
SARS-CoV-2	USA-WA1/2020	2500	40	40	100,00
		1875	40	40	100,00
		1250	40	40	100,00
		625	36	40	90,00
		313	27	38*	71,05
		156	22	40	55,00
		78	10	40	25,00

<sup>†</sup> Er werd vergelijkbare analytische gevoeligheid behaald met de CFX96-systemen

\* Voor de concentratie van 312,5 exemplaren/mL werden 2 replicaten als ongeldig gerapporteerd door de analysesoftware als gevolg van IC-falen. Deze werden uitgesloten van de analyse.

#### 16.2.2.2 Workflow met de MGISP-960 & LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II

Er is onderzoek gedaan door het Queensland Pediatric Infectious Diseases Laboratory (QPID), South Brisbane, QLD, om aan te tonen dat de analytische prestaties van de *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2-assay wanneer samples worden geëxtraheerd met behulp van het MGISP-960-instrument (MGI) met de MGIEasy Nucleïnezuurextractiekit (PID: 1000020471; MGI), gelijk is aan de analytische onderzoeksprestaties wanneer samples worden geëxtraheerd met het MagNa Pure 96 (MP96)-instrument (Roche) met de MagNA Pure 96 DNA en Viral NA Small Volume Kit (PID: 06543588001; Roche). Negatief referentiemateriaal bestond uit gepoolde negatieve neus- en keel (NP)-uitslijpjes in virale transportmedia (VTM) verzameld van SARS-CoV-2-negatieve personen (**FDA Emergency Use Authorization COVID-19 Molecular Diagnostic Template for Commercial Manufacturers**). Positief referentiemateriaal bestond uit SARS-CoV-2-stam USA-WA1/2020 (ZeptoMetrix, NATrol<sup>™</sup> SARS-CoV-2 Stock, Cat nr. NATSARS(COV2)-ST), verrijkt met een negatieve matrix op 2x LOD.

Voor iedere geteste MGIEasy nucleïnezuurextractiekit werd het percentage correct geïdentificeerde samples uitgerekend. De resultaten zijn samengevat in **Tabel 14**. De gemiddelde Cq-waarde, standaarddeviatie en variatiecoëfficiënt (%) van elk doel (ORF1ab, RdRp en IC) voor elke extractiekit wordt beschreven in **Tabel 15**. De IC was geldig voor alle samples. Het succespercentage voor elke MGIEasy nucleïnezuurextractiekit was  $\geq 95\%$ , wat de LOD bevestigd van de *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2-assay bij gebruik met monsters die zijn geëxtraheerd met het MGISP-960-instrument (MGI).

Tabel 14. Succespercentage (%) monsters geëxtraheerd met MGISP-960

Monsters	Totaal aantal replicaten	Extractiekit 1		Extractiekit 1	
		Aantal correct geïdentificeerde replicaten	Trefpercentage (%)	Aantal correct geïdentificeerde replicaten	Trefpercentage (%)
SARS-CoV-2-positieve monsters (2X LOD)	30	30	100	30	100
SARS-CoV-2-negatieve monsters	60	60	100	60	100

Tabel 15. Overzichtstabel met gemiddelde Cq-waarden, standaarddeviaties en %CV voor alle doelen.

	Extractiepartij 1								
	ORF1ab (465-510)			RdRp (533-580)			IC (533-610)		
Soort monster	Gemiddelde Cq	SD	%CV	Gemiddelde Cq	SD	%CV	Gemiddelde Cq	SD	%CV
SARS-positief	21,06	0,34	1,61	22,19	0,39	1,76	21,38	0,32	1,51
SARS-negatief	--	--	--	--	--	--	21,62	0,44	2,05
	Extractiepartij 2								
	ORF1ab (465-510)			RdRp (533-580)			IC (533-610)		
Soort monster	Gemiddelde Cq	SD	%CV	Gemiddelde Cq	SD	%CV	Gemiddelde Cq	SD	%CV
SARS-positief	22,20	0,38	1,70	23,27	0,41	1,76	21,44	0,34	1,60
SARS-negatief	--	--	--	--	--	--	21,87	0,23	1,03

### 16.2.3 Analytische specificiteit

Er werd een paneel van 20 micro-organismen geëvalueerd voor bewijs van kruisreactiviteit in de **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-assay. Hieronder bevonden zich organismen die vaak worden gevonden in de luchtwegen en ook organismen die nauw samenhangen met SARS-CoV-2. Dit onderzoek werd uitgevoerd op het LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II. Een lijst met de geteste organismen wordt weergegeven in **Tabel 16**. Organismen werden getest op  $1 \times 10^6$  cfu/mL,  $1 \times 10^5$  pfu/mL of  $10^5$  TCID<sub>50</sub> per mL tenzij anders aangegeven. Alle verdunningen werden bereid in negatieve nasofaryngeale uitstrijkjes in VTM. De testen werden in drievoud uitgevoerd bij afwezigheid van het positieve referentiemateriaal (SARS-CoV-2). Er werden bij geen van deze experimenten positieve signalen gegenereerd in de **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-assay bij afwezigheid van het target en er werd geen impact waargenomen op de prestatie van de assay bij aanwezigheid van hoge concentraties van de geteste micro-organismen.

Tabel 16. Op kruisreactiviteit geteste micro-organismen	
Organismen	Geteste concentratie
Humaan coronavirus 229E	5,00E+06 genomen/mL
Humaan coronavirus OC43	5,00E+06 genomen/mL
Adenovirus 1	1,00E+05 TCID <sub>50</sub> /mL
Parainfluenzavirus 3	1,00E+05 TCID <sub>50</sub> /mL
Influenza A-virus	1,00E+05 PFU/mL
Influenza B-virus	1,00E+05 PFU/mL
Enterovirus A71	1,00E+05 TCID <sub>50</sub> /mL
Respiratoir syncytieel virus A	1,00E+05 PFU/mL
Rhinovirus 17	1,00E+05 TCID <sub>50</sub> /mL
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Haemophilus influenzae</i>	5,00E+06 genomen/mL
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Bordetella pertussis</i>	1,45E+05 genomen/mL
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,00E+06 CFU/mL
Samengevoegde menselijke neusspoeling	onverdund
<i>Candida albicans</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Streptococcus salivarius</i>	2,51E+08 genomen/mL

#### 16.2.4 *In silico*-analyse

Er werd een *in silico*-analyse uitgevoerd om de mogelijkheid tot kruisreactiviteit te beoordelen van primers en sondes met aanvullende humane en niet-humane coronavirussen opgenomen in de **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-assay. De **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-assay vertoonde, gebaseerd op een homologiesdrempel van >80%, geen voorspelde kruisreactiviteit met niet-coronavirussen of andere humane coronavirussequenties.

##### Specificiteit tegen niet-coronavirussequenties

De oligosequenties van de ORF1ab- en RdRp-assay werden gebruikt voor het vinden van niet-coronavirussequenties die nauw verband hielden met de targetregio om zo de mogelijkheid tot kruisreactiviteit te beoordelen. Er werd bij geen van de oligo's van de assay significante kruisreactiviteit waargenomen met niet-coronavirusorganismen.

##### Specificiteit tegen andere coronavirussen

De BLAST-run met het RdRp-assay-amplicon resulteerde in 3.027 coronavirussequenties. Bij analyse met CLC main workbench 20.0.4, waren de enige sequenties waarbij de oligo's van de assay zich kunnen binden de synthetische SARS-CoV-2-constructen en twee vleermuis-coronavirussequenties (MN996532.1 en KP876546.1). Er werd dus geen kruisreactiviteit met andere humane coronavirussequenties waargenomen.

De BLAST-run met het ORF1ab-assay-amplicon resulteerde in 272 coronavirussequenties. Bij analyse met CLC main workbench 20.0.4, waren de enige sequenties waarbij de oligo's van de assay zich kunnen binden de synthetische SARS-CoV-2-constructen. Er werd dus geen kruisreactiviteit met andere humane coronavirussequenties waargenomen.

#### 16.2.5 Inclusiviteit

Op 1 juni 2020 werd de GISAID EpiCoV-database geraadpleegd. De resulterende dataset bevatte 24.462 SARS-CoV-2-geenoomsequenties voor de ORF1ab-assay en de RdRp-assay.

Voor het aantonen van de inclusiviteit van de **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-assay werd de GISAID EpiCoV onafhankelijk bevestigd met elke oligonucleotide-primer en -sonde die in de assay was opgenomen. Minder dan 0,2% van de SARS-CoV-2-sequenties in de database (n >24.000 vanaf 1 juni 2020) had meer dan 1 discrepantie met een van de primers of sondes die in de **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-assay waren opgenomen. Monitoring is ongoing to ensure continued inclusivity to current strains and reported variants. Please contact [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) for more information.

#### 16.2.6 Potentieel interfererende substanties

Potentieel interfererende endogene en exogene substanties die aanwezig kunnen zijn in monsters uit de luchtwegen werden beoordeeld op hun impact op de prestatie van de **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-assay. Dit onderzoek werd uitgevoerd op het LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II. Alle substanties werden in drievoud getest door middel van negatieve nasofaryngeale uitstrijkjes in VTM bij aanwezigheid en afwezigheid van de target. Er was geen bewijs van negatieve impact op de prestatie van de assay wanneer werd getest met kunstmatige monsters die de potentieel interfererende substanties in de aangegeven concentraties bevatten. De resultaten zijn samengevat in **Tabel 17**.

Tabel 17. Potentieel interfererende substanties in monsters uit de luchtwegen	
Potentieel interfererende substantie	Testconcentratie
Fenylefrine	15% w/v
Beclometasondipropionaat	5% v/v
Zanamivir	3,3 mg/mL
Ribavirine	2% w/v
Mupirocine	6,6 mg/mL
Tobramycine, aminoglycoside-antibioticum	4,4 µg/mL
Menthol	6,9 mg/mL

## 17 Klantondersteuning en technische ondersteuning

Neem contact op met de technische ondersteuning als u vragen hebt over de reactieopstelling, cyclusomstandigheden en andere vragen.

Tel: +61 2 9209 4169, E-mail: [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au)

## 18 Referenties

1. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report – 1, 21 januari 2020. Wereldgezondheidsorganisatie. Geraadpleegd op: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf>.
2. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Wereldgezondheidsorganisatie. Geraadpleegd op: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).
3. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University. Geraadpleegd op: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.

## 19 Bijlage 1: LightCycler® 480 Instrument II

De volgende informatie is gebaseerd op de LightCycler® 480-software (versie 1.5).

De **PlexPCR**® SARS-CoV-2-kit bevat kleurstoffen voor het LightCycler® 480 Instrument II. De **PlexPCR**® Colour Compensation-kit (catalogusnr. 90001) moet worden uitgevoerd en toegepast voor LC480 II-analyse (zie **paragraaf 19.3**). Deze kit is op aanvraag leverbaar.

### 19.1 Het LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II) programmeren

#### Detectieformaat

Maak een aangepast **Detection Format** (detectieformaat)

##### Open Tools (Open hulpmiddelen) > Detection Formats (detectieformaten)

Maak een nieuw detectieformaat aan en noem dit '**SpeedX Plex PCR**' (kan worden aangemaakt tijdens het genereren van het SpeedX Colour Compensation-bestand (kleurcompensatiebestand) (zie **Afbeelding 2**).

Selecteer voor **Filter Combination Selection** (keuze filtercombinatie) de volgende (Excitation-Emission (excitatie-emissie)):

Tabel 18. Filtercombinaties<sup>\*</sup>

LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

<sup>\*</sup>Deze Filter Combinations (filtercombinaties) zijn de standaardnamen voor de kanalen

Stel de **Selected Filter Combination List** (lijst met geselecteerde filtercombinaties) voor alle kanalen in als:

Melt Factor (smeltfactor): 1

Quant Factor (kwantitatieve factor): 10

Max Integration Time (maximale integratietijd) (s): 1

Afbeelding 2. Aangepast SpeedX-detectieformaat

**Filter Combination Selection**

Emission

	488	510	580	610	640	660
440	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
465	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
498	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
533	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
618	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

---

**Selected Filter Combination List**

Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)
440	488	440-488	1	10	1
465	510	465-510	1	10	1
533	580	533-580	1	10	1
533	610	533-610	1	10	1
533	640	533-640	1	10	1
618	660	618-660	1	10	1

### Instrumentinstellingen

Maak een aangepast **Detection Format** (detectieformaat)

**Open Tools (open hulpmiddelen) > Instruments (instrumenten)**

Voor **Instrument Settings** (instrumentinstellingen) > selecteer **Barcode Enabled** (barcode ingeschakeld)

### Installatie voor experiment

Selecteer **New Experiment** (nieuw experiment)

Ga als volgt te werk op het tabblad **Run Protocol** (run-protocol)

Voor **Detection Format** (detectieformaat) selecteert u het aangepaste '**SpeedX PlexPCR**' (Afbeelding 3)

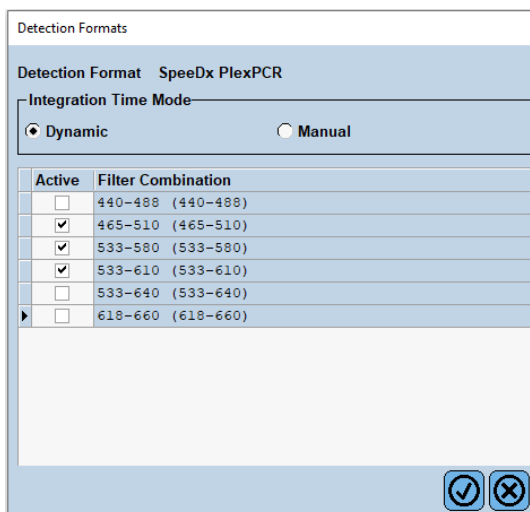
Selecteer **Customize** (aanpassen) >

Selecteer **Integration Time Mode** (modus integratietijd) > **Dynamic** (dynamisch)

Selecteer de volgende actieve **Filter Combinations** (filtercombinaties) die worden weergegeven in **Tabel 19**

Tabel 19. Kanalen voor PlexPCR® SARS-CoV-2-targets			
Kanaal	465-510	533-580	533-610
SARS-CoV-2	ORF1ab	RdRp	Internal Control (interne controle)

**Afbeelding 3. Detection Format (detectieformaat) aanpassen**



Om geautomatiseerde monsterdetectie in de analysesoftware mogelijk te maken, kent u naamtags toe aan de wells op de plaat (zie **paragraaf 21.4**)

Open de module **Sample Editor** (monstereitor)

Selecteer well

Bewerk **Sample Name** (monsternaam) zodat deze overeenkomt met de naamtags die zijn gedefinieerd in de Assays-module van de analysesoftware (zie **paragraaf 21.4**)













Monsters worden voorzien van een label in de vorm *Voorvoegsel\_Achtersvoegsel* (zoals weergegeven in **Tabel 20** en **Afbeelding 4**) bijv. NEG\_CoV

**NB:** De naamtags van monsters zijn hoofdlettergevoelig. De naamtag moet exact overeenkomen met de toegewezen namen in het run-bestand.



Tabel 20. Naamtags van monsters voor analysesoftware			
Soort monster	Voorvoegsel_ (in analysesoftware)	Achtervoegsel_ (in analysesoftware)	Naam monster (in analysesoftware)
Regulier monster	Sample (Monster)	_CoV	Sample_CoV
Negatieve controle	N	_CoV	N_CoV
Positieve controle	Pa	_CoV	Pa_CoV

Afbeelding 4. Sample Editor (monstreditor) – naamtags toewijzen aan wells

Pos	Filter combination	Color	Repl Of	Sample Name
A12	465-510 (465-510)			S_MG
A12	533-580 (533-580)			S_MG
A12	533-640 (533-640)			S_MG
B12	465-510 (465-510)			Pa_MG
B12	533-580 (533-580)			Pa_MG
B12	533-640 (533-640)			Pa_MG
C12	465-510 (465-510)			Pb_MG
C12	533-580 (533-580)			Pb_MG
C12	533-640 (533-640)			Pb_MG
G8	465-510 (465-510)			N_MG
G8	533-580 (533-580)			N_MG
G8	533-640 (533-640)			N_MG

Stel het **Reaction Volume** (reactievolume) in op > 10µL

Maak het volgende programma aan (in meer detail weergegeven in **Afbeelding 5 - Afbeelding 9**)

Tabel 21. Thermocycling Program (Thermocyclingprogramma)					
Programmanaam	Cycles (cycli)	Target °C	Hold (duur)	Ramp Rate (toename) (°C/s)*	Ramp Rate (toename) (°C/s)§
Reverse-transcriptie	1	48 °C	10 min	4,4	4,8
Polymerase-activering	1	95 °C	2 min	4,4	4,8
Touch down cycling (touchdowncycli) <sup>§</sup> : Step down (stapsgewijze afname) -0,5 °C/cyclus	10	95 °C	5 s	4,4	4,8
		61 °C – 56,5 °C <sup>§</sup>	30 s	2,2	2,5
Kwantificeringscycli <sup>+</sup> : Acquisitie/Detectie	40	95 °C	5 s	4,4	4,8
		52 °C <sup>+</sup>	50 s	2,2	2,5
Cooling (afkoeling)	1	40 °C	30 s	2,2	2,5

\* Standaardtoename (96-wells plaat)

§ Standaardtoename (384-wells-plaat)

§ Stapgrootte: -0,5 °C/Cycle, Sec Target: 56 °C

+ Analysemodus: Kwantificering, Acquisitiemodus: Enkelvoudig

> Start Run (run starten)

Afbeelding 5. Thermocyclingprogramma – reverse-transcriptie

LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Traceable)

Window: New Experiment User: System Admin

Setup: Detection Format SpeedX FlexPCR Block Size 96 Plate ID Reaction Volume 10

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Reverse Transcription	1	None
Polymerase Activation	1	None
Touchdown Cycling	10	None
Quantification Cycling	40	Quantification
Cool Down	1	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
48	None	00:10:00	4.4	0	0	0	0

Afbeelding 6. Thermocyclingprogramma – polymeraseactivering

LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Traceable)

Window: New Experiment User: System Admin

Setup: Detection Format SpeedX FlexPCR Block Size 96 Plate ID Reaction Volume 10

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Reverse Transcription	1	None
Polymerase Activation	1	None
Touchdown Cycling	10	None
Quantification Cycling	40	Quantification
Cool Down	1	None

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:02:00	4.4	0	0	0	0

Afbeelding 7. Thermocyclingprogramma – touchdowncycli

LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Traceable)

Window: New Experiment User: System Admin

Setup: Detection Format SpeedX FlexPCR Block Size 96 Plate ID Reaction Volume 10

Programs			Cycles	Analysis Mode
Reverse Transcription	1	None		
Polymerase Activation	1	None		
Touchdown Cycling	10	None		
Quantification Cycling	40	Quantification		
Cool Down	1	None		

Touchdown Cycling Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
61	None	00:00:30	2.2	56	0.5	0	0

Afbeelding 8. Thermocyclingprogramma – kwantificeringscycli

LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Traceable)

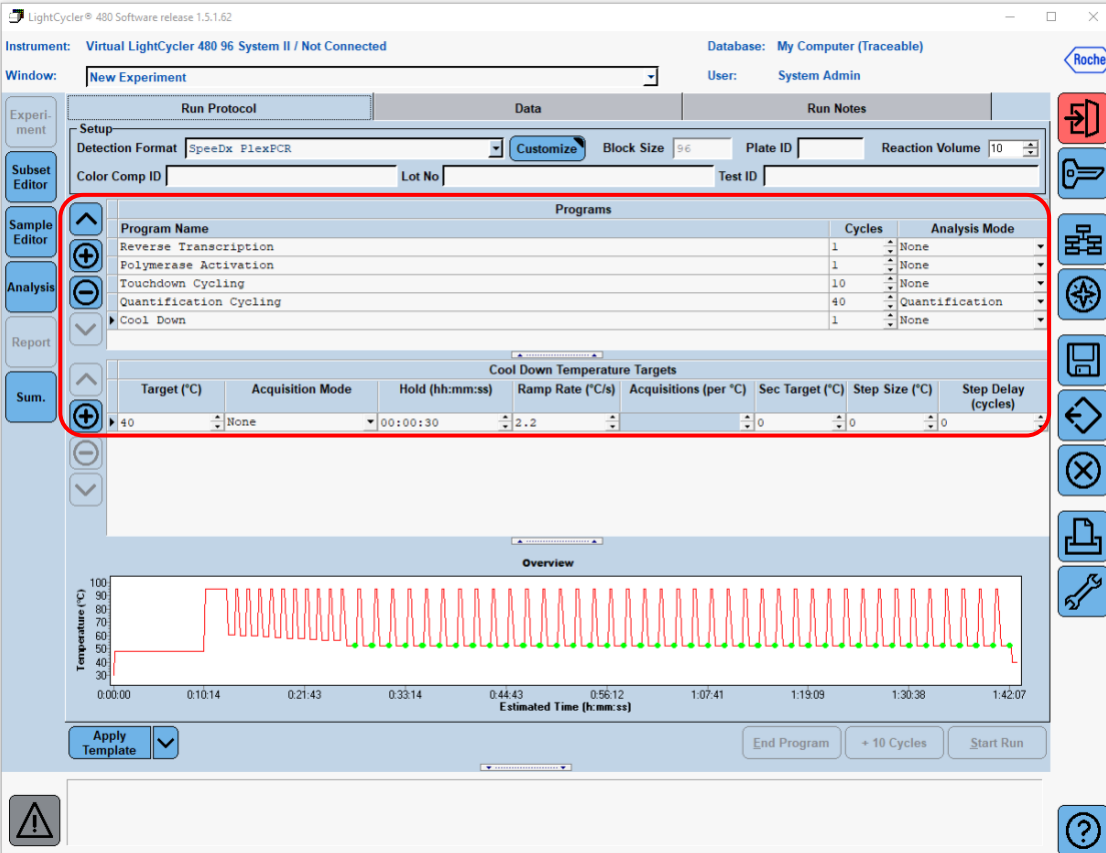
Window: New Experiment User: System Admin

Setup: Detection Format SpeedX FlexPCR Block Size 96 Plate ID Reaction Volume 10

Programs			Cycles	Analysis Mode
Reverse Transcription	1	None		
Polymerase Activation	1	None		
Touchdown Cycling	10	None		
Quantification Cycling	40	Quantification		
Cool Down	1	None		

Quantification Cycling Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
52	Single	00:00:50	2.2	0	0	0	0

Afbeelding 9. Thermocyclingprogramma – afkoeling



LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Traceable)

Window: New Experiment User: System Admin

Run Protocol | Data | Run Notes

Setup

Detection Format: SpeedX PlexPCR Customize Block Size: 96 Plate ID: Reaction Volume: 10

Color Comp ID: Lot No: Test ID:

Programs		
Program Name	Cycles	Analysis Mode
Reverse Transcription	1	None
Polymerase Activation	1	None
Touchdown Cycling	10	None
Quantification Cycling	40	Quantification
Cool Down	1	None

Cool Down Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2.2	0	0	0	0

Overview

Temperature (°C) vs Estimated Time (h:mm:ss)

Apply Template | End Program | + 10 Cycles | Start Run

Wanneer het cyclingprogramma is afgelopen moet een .ix0 -bestand worden geëxporteerd voor analyse in de **PlexPCR**® SARS-CoV-2 (LC480)-analysesoftware.

Selecteer **Export** (Exporteren)

Sla dit op een duidelijk herkenbare locatie op

## 19.2 Het opzetten van een macrosjabloon voor het LightCycler® 480 Instrument II

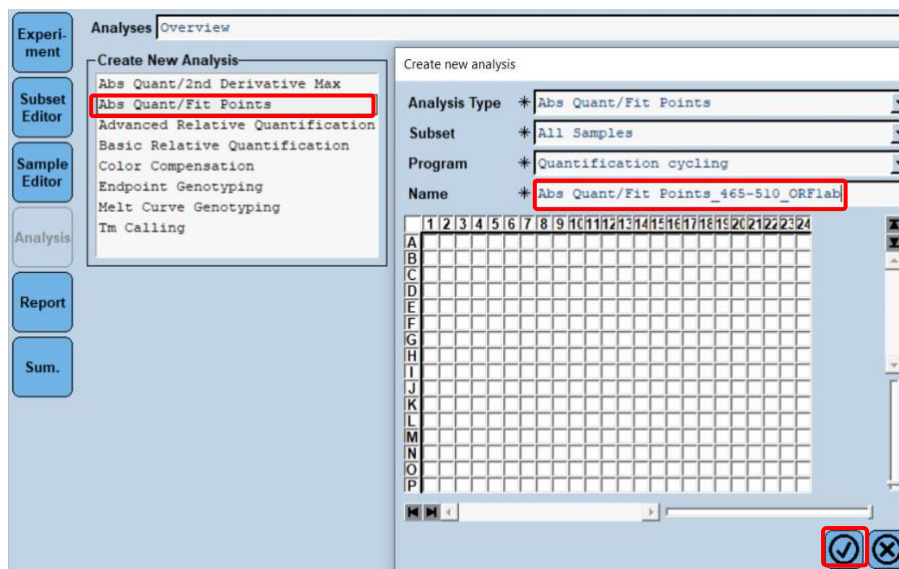
Gegevensinterpretatie kan worden uitgevoerd met gebruik van de LC480 II on-board software door een macrosjabloon te gebruiken met de onderstaande gevalideerde parameters. Neem voor verdere ondersteuning contact op met [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

### Instellingen Macro-sjabloon

Selecteer een run-bestand met de **SpeedX PlexPCR-cyclus**-parameters

Selecteer **Analyse > Abs hoev./Fitpunten > verander de naam in Abs hoev./Fitpunten\_465-510\_ORF1ab > Ok**

Afbeelding 10. Abs hoeve/Fitpunten - 465-510 ORF1ab

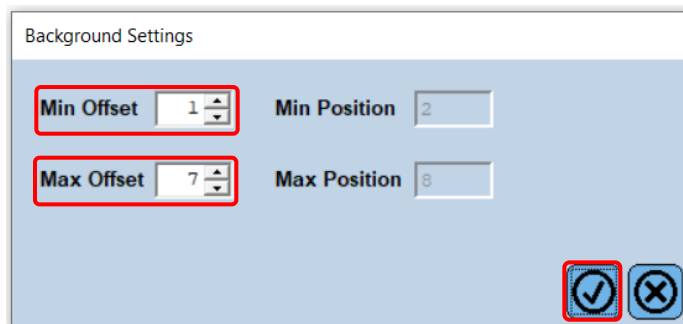


Selecteer **Filter Comb 465 – 510**

Pas de **Kleurcompensatie** toe voor alle kanalen > **Ok**

Selecteer het tabblad **Cyclusbereik** > **Achtergrondinstellingen** > bewerk de **Min Offset** en **Max Offset** > **Ok**

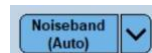
Afbeelding 11. Achtergrondinstellingen - 465-510 ORF1ab



Selecteer het tabblad **Analyse** en zorg ervoor dat de volgende instelling is geselecteerd

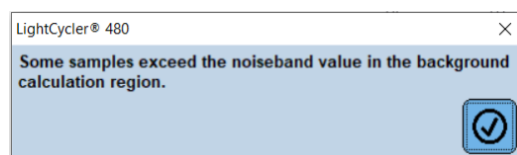


Selecteer het tabblad **Geluidsband** en zorg ervoor dat de volgende instelling is geselecteerd



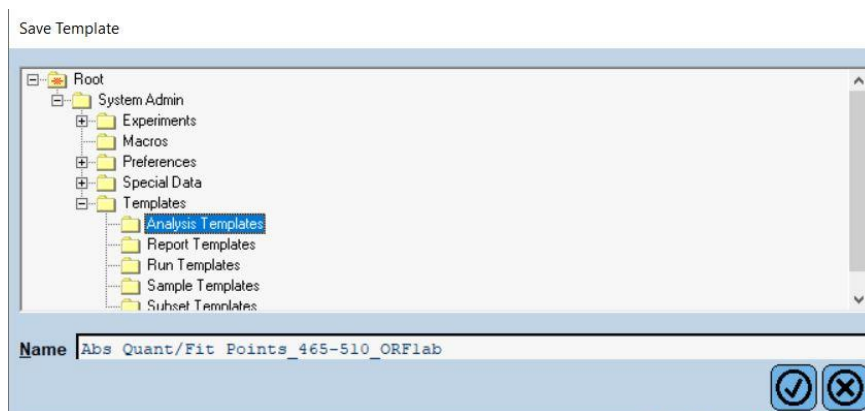
Klik op **Calculate** (als een monstercurve de achtergrondregio heeft doorkruist, verschijnt de volgende boodschap (Afbeelding 12); de gebruiker moet het monster verdunnen en opnieuw testen) > **Ok** om verder te gaan met de analyse

**Afbeelding 12. Waarschuwingsbericht geluidsband**




Selecteer **Als sjabloon opslaan** met behulp van de map **Sjablonen > Analysesjablonen** en vermeld het kanaal en doel in de naamindeling > **Ok**

**Afbeelding 13. Opslaan analysesjabloon Abs hoev./Fitpunten – 465-510 ORFlab**

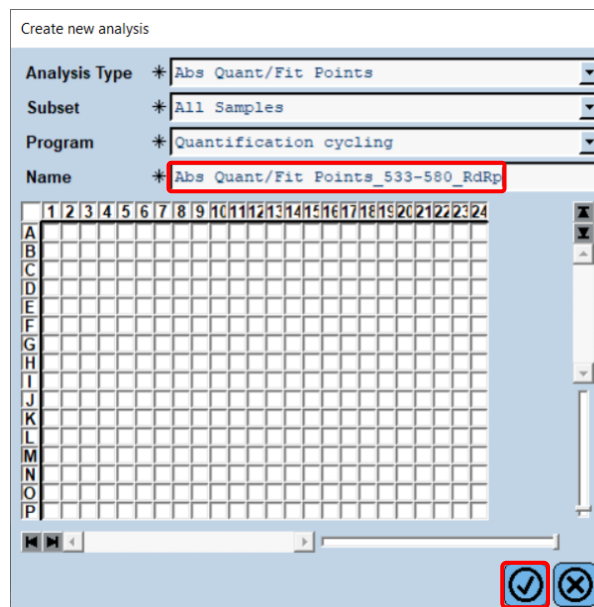


Klik op het  -pictogram om de analyseparameters die voor het kanaal zijn ingesteld op te slaan

Klik op het  -pictogram om een **nieuwe analyse** te maken

Selecteer **Abs hoev./Fitpunten** > wijzig de naam in **Abs hoev./Fitpunten\_533-580\_RdRp** > **Ok**

**Afbeelding 14. Abs hoev./Fitpunten 533-580 RdRp**

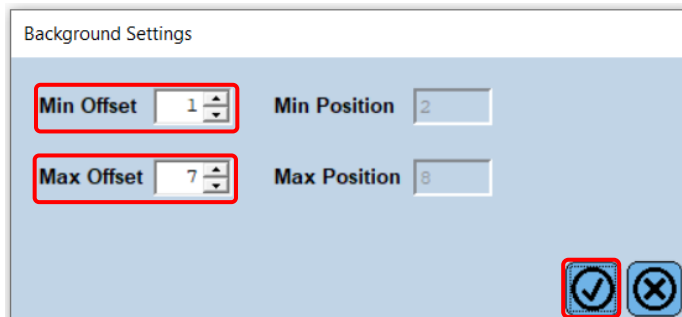


Selecteer **Filter Comb 533 – 580**

Pas de **Kleurcompensatie** toe voor alle kanalen > **Ok**

Selecteer het tabblad **Cyclusbereik** > **Achtergrondinstellingen** > bewerk de **Min Offset** en **Max Offset** > **Ok**

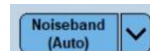
**Afbeelding 15** Achtergrondinstellingen - 533-6580 RdRp



Selecteer het tabblad **Analyse** en zorg ervoor dat de volgende instelling is geselecteerd

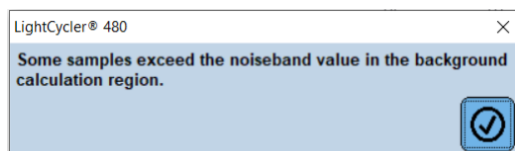


Selecteer het tabblad **Geluidsband** en zorg ervoor dat de volgende instelling is geselecteerd



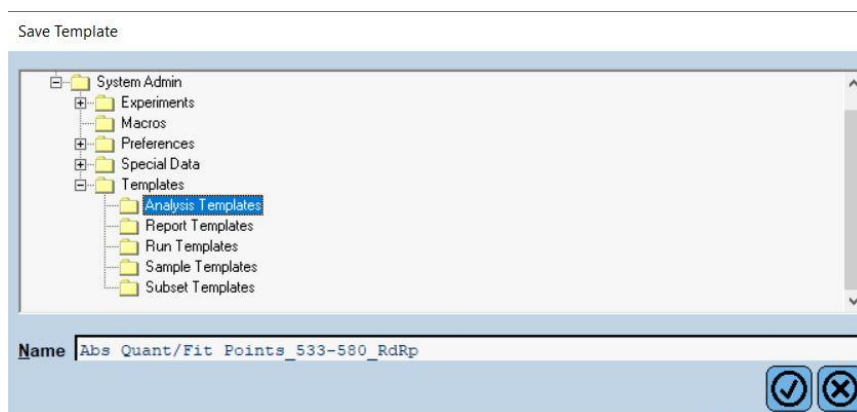
Klik op **Calculate** (als een monstercurve de achtergrondregio heeft doorkruist, verschijnt de volgende boodschap (**Afbeelding 16**); de gebruiker moet het monster verdunnen en opnieuw testen) > **Ok** om verder te gaan met de analyse

**Afbeelding 16.** Waarschuwingsbericht geluidsband




Selecteer **Als sjabloon opslaan** met behulp van de map **Sjablonen** > **Analysesjablonen** en vermeld het kanaal en doel in de naamindeling > **Ok**

**Afbeelding 17.** Opslaan analysesjabloon Abs hoev./Fitpunten – 533-580 RdRp

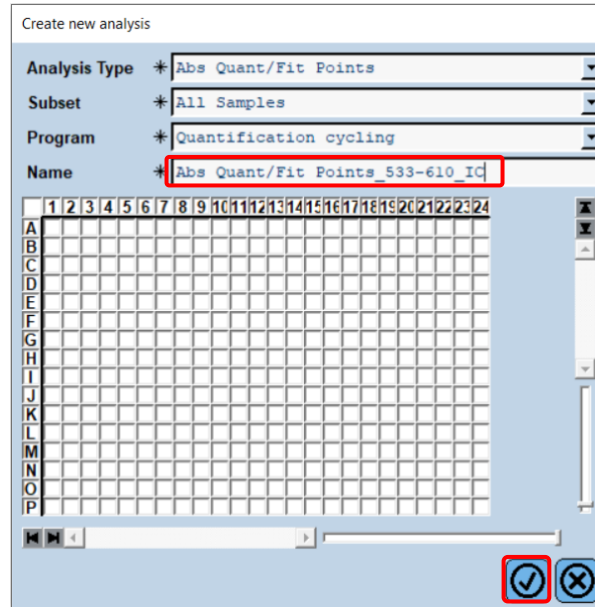


Klik op het  -pictogram om de analyseparameters die voor het kanaal zijn ingesteld op te slaan

Klik op het  -pictogram om een **nieuwe analyse** te maken

Selecteer **Abs hoev./Fitpunten** > wijzig de naam in **Abs hoev./Fitpunten\_533-610\_IC** > > **Ok**.

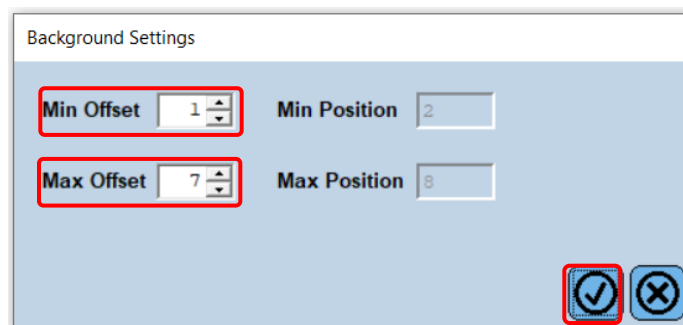
**Afbeelding 18. Abs hoev./Fitpunten 533-610 Interne controle**



Selecteer **Filtercomb 533 – 610**

Selecteer het tabblad **Cyclusbereik** > **Achtergrondinstellingen** > bewerk de **Min Offset** en **Max Offset** > **Ok**

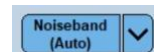
**Afbeelding 19. Achtergrondinstellingen - 533-610 Interne controle**



Selecteer het tabblad **Analyse** en zorg ervoor dat de volgende instelling is geselecteerd



Selecteer het tabblad **Geluidsband** en zorg ervoor dat de volgende instelling is geselecteerd

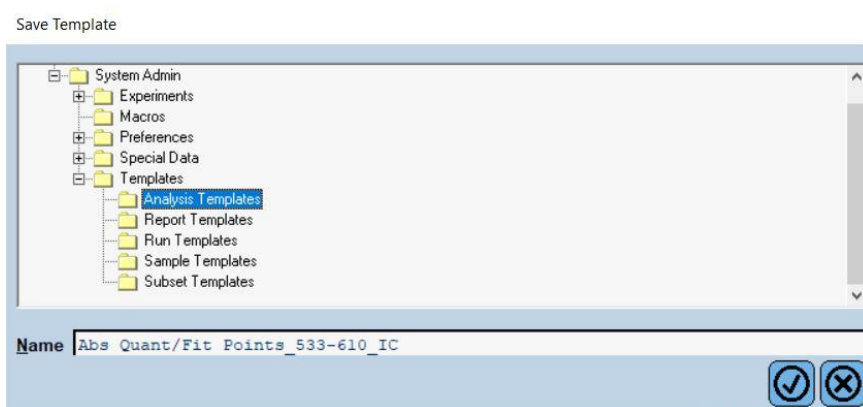


Klik op **Berekenen**

Selecteer **Als sjabloon opslaan** met behulp van de map **Sjablonen** > **Analysesjablonen** en vermeld het kanaal en doel in de naamindeling > **Ok**

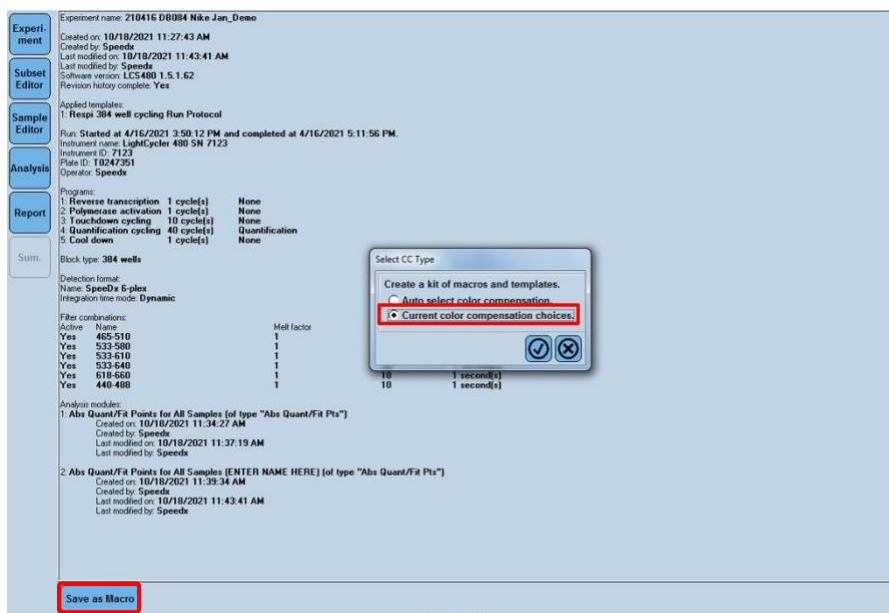


## Afbeelding 20. Opslaan analysesjabloon Abs hoeve./Fitpunten – 533-610 Interne controle



Selecteer het tabblad **Samenvatting** > **Opslaan als macro** > **Huidige kleurcompensatiekeuzes**

## Afbeelding 21. CC-type wordt geselecteerd

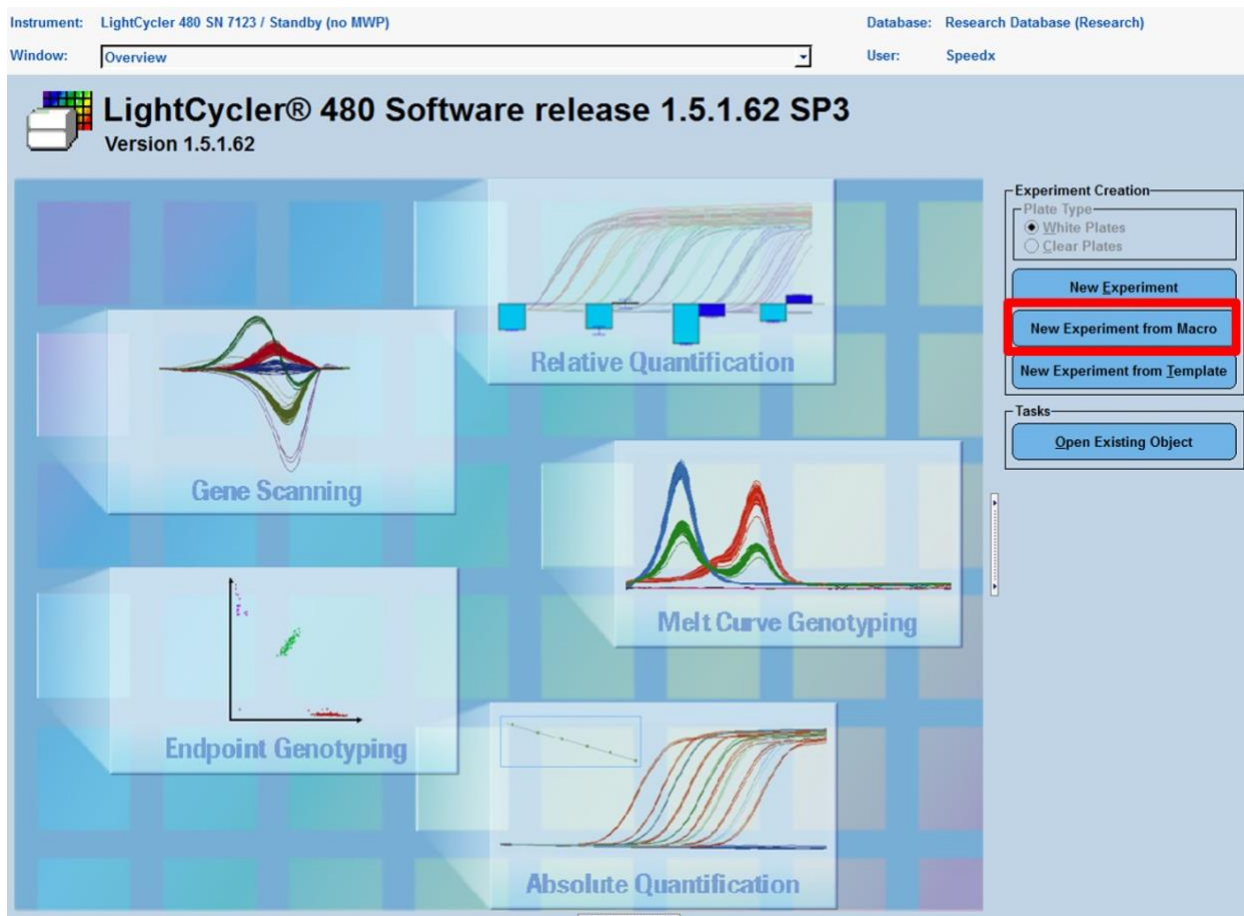


Dit **macrosjabloon** kan vanaf nu worden geselecteerd bij het instellen van een run.

### Instelling macro-sjabloon

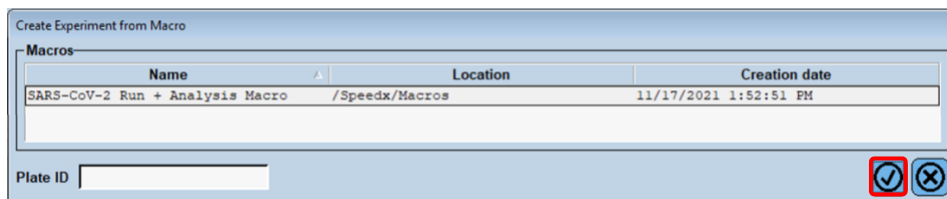
Selecteer **Nieuw experiment uit Macro geselecteerd**

Afbeelding 22. Er wordt een Nieuw experiment uit Macro geselecteerd



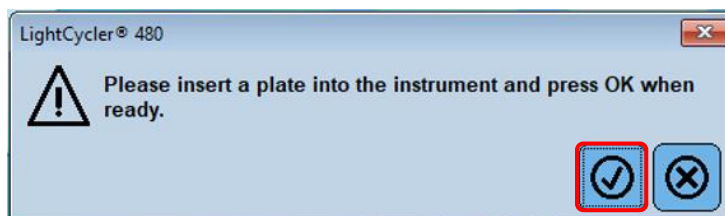
Selecteer het bestand uit de map **Macros** > **Ok**

Afbeelding 23. Macro-sjabloon wordt geselecteerd



Plaats de voorbereide PCR-plaat als de volgende melding verschijnt > **Ok** , waar de run automatisch begint

Afbeelding 24. Voeg plaatbericht in



Ga verder met het gebruik van de **Subset-editor** en **Monster-editor** om te zorgen voor de juiste labeling voor de uitvoer van de resultaten

### 19.3 Colour Compensation (kleurcompensatie) voor LightCycler® 480 Instrument II

**NB:** De **PlexPCR®** Colour Compensation-kit (kleurcompensatiekit) (catalogusnr. 90001) moet worden uitgevoerd en toegepast voor LC480 II-analyse. Deze kit is op aanvraag leverbaar.

Om de analyse uit te voeren, moet de Sample Name (monsternaam) van de kleurcompensatiereacties worden gelabeld zoals weergegeven in **Tabel 22**.

Wanneer het cyclingprogramma is afgelopen moet een .ix0 -bestand worden geëxporteerd voor analyse in de **PlexPCR®** SARS-CoV-2 (LC480)-analysesoftware.

Selecteer **Export** (Exporteren)

Sla dit op een duidelijk herkenbare locatie op

Tabel 22. Monsternaam voor kleurcompensatiereacties voor de analysesoftware							
Reacties							
	BLANK (BLANCO)	488 mix	510 mix (510-mix)	580 mix (580-mix)	610 mix (610-mix)	640 mix (640-mix)	660 mix (660-mix)
Dominant kanaal	Water	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	610-660
Naam monster	BLANK (BLANCO)	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	610-660

### 19.4 Interpretatie van de resultaten

Gegevensinterpretatie kan worden uitgevoerd met gebruik van de LC480 II on-board software of de **PlexPCR®** SARS-CoV-2 (LC480)-analysesoftware. De **PlexPCR®** SARS-CoV-2 (LC480)-analysesoftware kan op verzoek worden geleverd. Neem voor meer informatie contact op met [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Voor interpretatie van resultaten zonder de **PlexPCR®** SARS-CoV-2 (LC480)-analysesoftware moet elk monster apart worden geanalyseerd. Zie **Tabel 23** voor informatie over hoe signalen van verschillende filtercombinaties moeten worden geïnterpreteerd.

Elke Cp die binnen de grenswaarde wordt geregistreerd, met visuele bevestiging van amplificatiecurve, is een positief resultaat (**Tabel 23**). Voorbeelden van amplificatiecurves worden weergegeven in **Afbeelding 25**.

**NB:** NTC-sample mag in geen enkele well een signaal produceren:

→ Resultaat is ONGELDIG en PCR moet worden HERHAALD.

#### **Internal Control (interne controle)**

De interne controle houdt extractie en PCR-inhibitie in de gaten. De interne controle is geldig als het 533-610 kanaal een Cp registreert binnen de grenswaarde (**Tabel 23**). Het is echter mogelijk om een positief signaal te hebben voor elk doel-assay (ORF1ab of RdRp) als de interne controle negatief is. Voor dergelijke samples wordt de aanwezigheid van het nog steeds opgevat als een geldig resultaat.

**NB:** Voor samples waar doel-assays negatief zijn, en de interne controle ook negatief is:

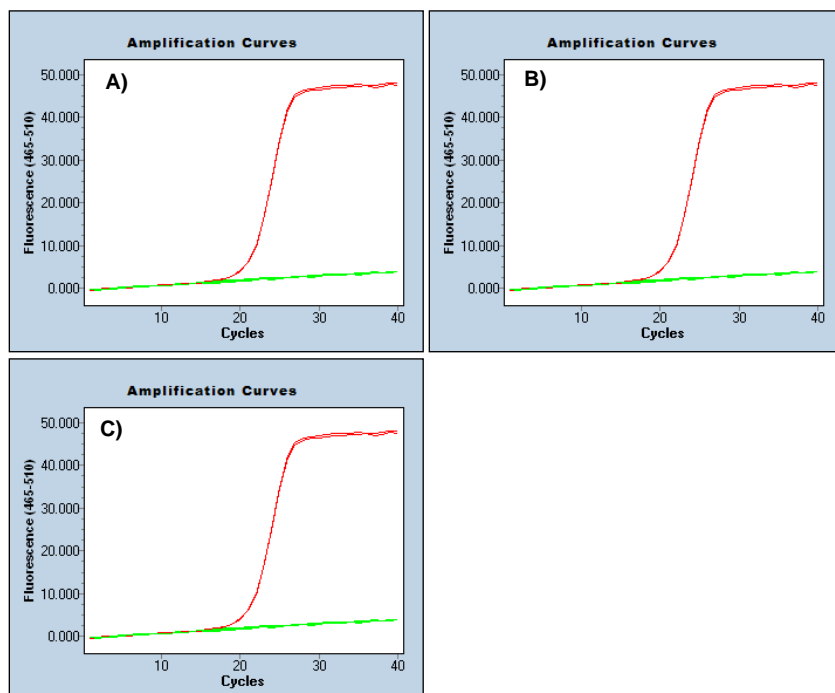
→ Resultaat is ONGELDIG en de extractie en PCR moeten worden HERHAALD.

Tabel 23. Interpretatie van resultaten (LC480 II)

Interpretatie	Target		
	ORF1ab (465-510)	RdRp (533-580)	Interne controle (533-610) <sup>^</sup>
SARS-CoV-2 detected	< 31	n.v.t.	n.v.t.
SARS-CoV-2 detected	n.v.t.	< 31	n.v.t.
SARS-CoV-2 niet gedetecteerd. IC geldig.	≥ 31	≥ 31	≤ 26
IC ongeldig. Monster opnieuw extraheren en opnieuw testen.	≥ 31	≥ 31	≥ 26

<sup>^</sup>Als de interne controle negatief is, maar een doel-assay is positief, dan is het resultaat nog steeds geldig.

Abbeelding 25. Voorbeeld van amplificatiecurves voor A) ORF1ab, B) RdRp, C) Interne controle. (Positief (rood) en Negatief (groen))



Zie **Bijlage A: Interpretatie van de resultaten** voor instructies over het gebruik van de *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2 (LC480)-analysesoftware.

## 20 Bijlage 2: Bio-Rad CFX96™ Dx en CFX96 Touch™ realtime PCR-systeem

De volgende informatie is gebaseerd op de CFX Manager Dx-software (versie 3.1).

De **PlexPCR**® SARS-CoV-2-kit bevat kleurstoffen voor het CFX96 Dx-systeem. Er wordt gebruikgemaakt van standaard kleurstofkalibraties voor alle kanalen. Kalibratie door de gebruiker is niet nodig.

### 20.4 Het CFX96™ Dx en CFX96 Touch™ realtime PCR-detectiesysteem (CFX96 Dx, CFX96 Touch) programmeren

Selecteer **View** (weergave) > open **Run Setup** (run instellen)

In **Run Setup** (run instellen) > tabblad **Protocol** (protocol) > selecteert u **Create New** (nieuwe aanmaken)

In de **Protocol Editor** (protoleeditor) (zie **Afbeelding 26**):

Stel **Sample Volume** (monstervolume) in op > 10 µL

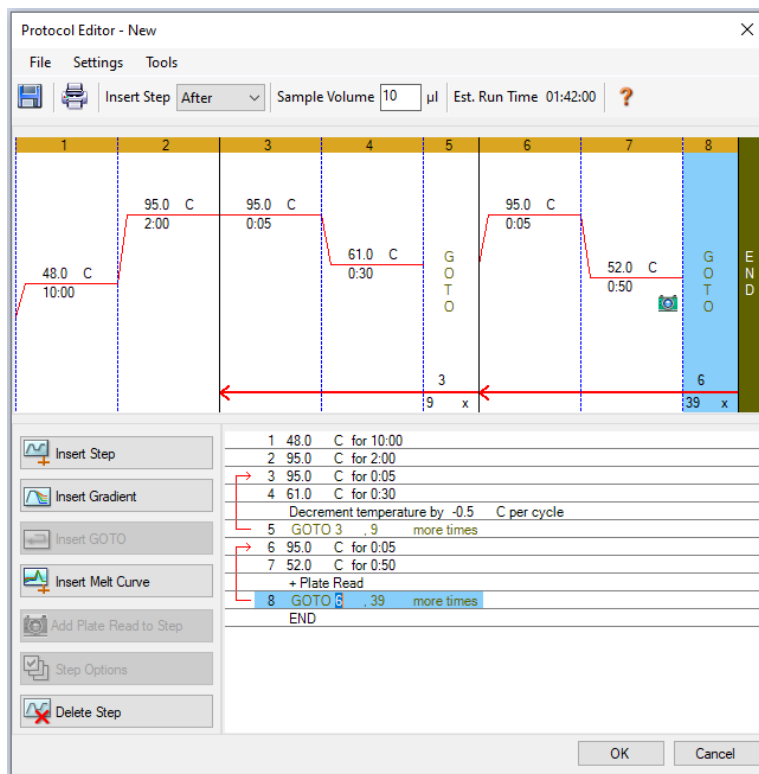
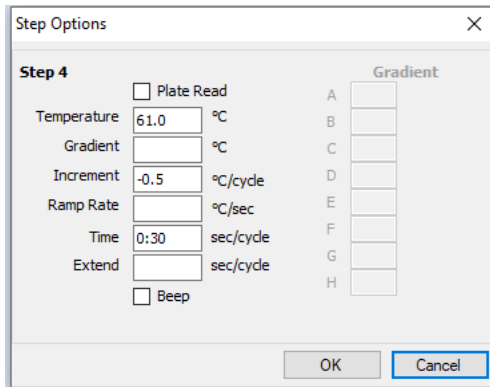
Maak het volgende thermocyclingprogramma aan en sla dit op als '**SpeedX PCR**'. Dit protocol kan worden geselecteerd voor toekomstige runs.

Voor touchdowncycli selecteert u stap 3 en selecteert u **Step options** (stappenopties) > Increment (toename): -0,5 °C/cyclus (in meer detail weergegeven in **Afbeelding 27**).

Tabel 24. Thermocycling Program (Thermocyclingprogramma)			
Programmaam	Cycles (cycli)	Target °C	Hold (duur)
Reverse-transcriptie	1	48 °C	10 min
Polymerase-activating	1	95 °C	2 min
Touch down cycling (touchdowncycli) <sup>o</sup> :	10	95 °C	5 s
Step down (stapsgewijze afname) -0,5 °C/cyclus		61 °C – 56,5 °C <sup>o</sup>	30 s
Quantification cycling (kwantificeringscycli) <sup>*</sup> :	40	95 °C	5 s
Acquisitie/detectie		52 °C <sup>*</sup>	50s

<sup>o</sup> **Step options** (stappenopties) > Increment (toename): -0,5 °C/cyclus

<sup>\*</sup> **Add Plate Read to Step** (plaat lezen toevoegen aan stap)

**Afbeelding 26. Thermocycling Protocol (thermocyclingprotocol) – Graphical view (grafische weergave)**

**Afbeelding 27. Step Options (Stappenopties)**


The 'Step Options' dialog box is shown for Step 4. It contains the following fields and options:

- Step 4**
- Plate Read
- Temperature: 61.0 °C
- Gradient: °C
- Increment: -0.5 °C/cycle
- Ramp Rate: °C/sec
- Time: 0:30 sec/cycle
- Extend: sec/cycle
- Beep
- Gradient** (A-H): A, B, C, D, E, F, G, H

Buttons for 'OK' and 'Cancel' are at the bottom.

In **Run Setup** (run instellen) > tabblad **Plate** (plaat)

Selecteer **Create New** (nieuwe maken)

Selecteer **Settings** (instellingen) > **Plate Type** (soort plaat) > Selecteer **BR Clear** (BR transparant)

Stel **Scan mode** (scanmodus) in op > All channels (alle kanalen)

Selecteer **Fluorophores** (fluoroforen) > FAM, HEX, Texas Red (zie **Tabel 25**)

Selecteer wells die monsters bevatten, wijs het **Sample Type** (monstertype) toe en controleer **Load** (belasting) voor fluoroforen (FAM, HEX, Texas Red)

Sla de plaat op

Tabel 25. Kanalen voor PlexPCR® SARS-CoV-2-targets			
Kanaal	FAM	HEX	Texas Red
SARS-CoV-2	ORF1ab	RdRp	Internal Control (interne controle)

In **Run Setup** (run instellen) > tabblad **Start Run** (run starten)

Selecteer blok

**Start Run (run starten)**

Om geautomatiseerde monsterdetectie in de analysesoftware mogelijk te maken kent u naamtags toe aan de wells op de plaat.

Open de module **Plate Setup** (plaat instellen)

Selecteer well

Bewerk **Sample Name** (monsternaam) zodat deze overeenkomt met de naamtags die zijn gedefinieerd in de **Assays**-module van de analysesoftware (zie **paragraaf 21.4**)

Monsters worden voorzien van een label in de vorm *Voorvoegsel\_Achtersvoegsel* (zoals weergegeven in **Tabel 26** en **Afbeelding 28**) bijv. NEG\_CoV

**NB:** De naamtags van monsters zijn hoofdlettergevoelig. De naamtag moet exact overeenkomen met de toegewezen namen in het run-bestand.

Tabel 26. Naamtags van monsters voor analysesoftware			
Soort monster	Voorvoegsel_ (in analysesoftware)	Achtersvoegsel_ (in analysesoftware)	Naam monster (in analysesoftware)
Regulier monster	Sample (Monster)	_CoV	Sample_CoV
Negatieve controle	N	_CoV	N_CoV
Positieve controle	Pa	_CoV	Pa_CoV

**Afbeelding 28. Sample Editor (monstreditor) – Naamtags toewijzen aan wells**

	1	2	3
A	Unk		
	FAM		
	HEX		
	Texas Red		
B	S-CoV		
	Unk		
	FAM		
	HEX		
C	Texas Red		
	P_CoV		
	Unk		
	FAM		
	HEX		
	Texas Red		
	N_CoV		

## 20.2 Interpretatie van de resultaten met behulp van de ingebouwde CFX-software

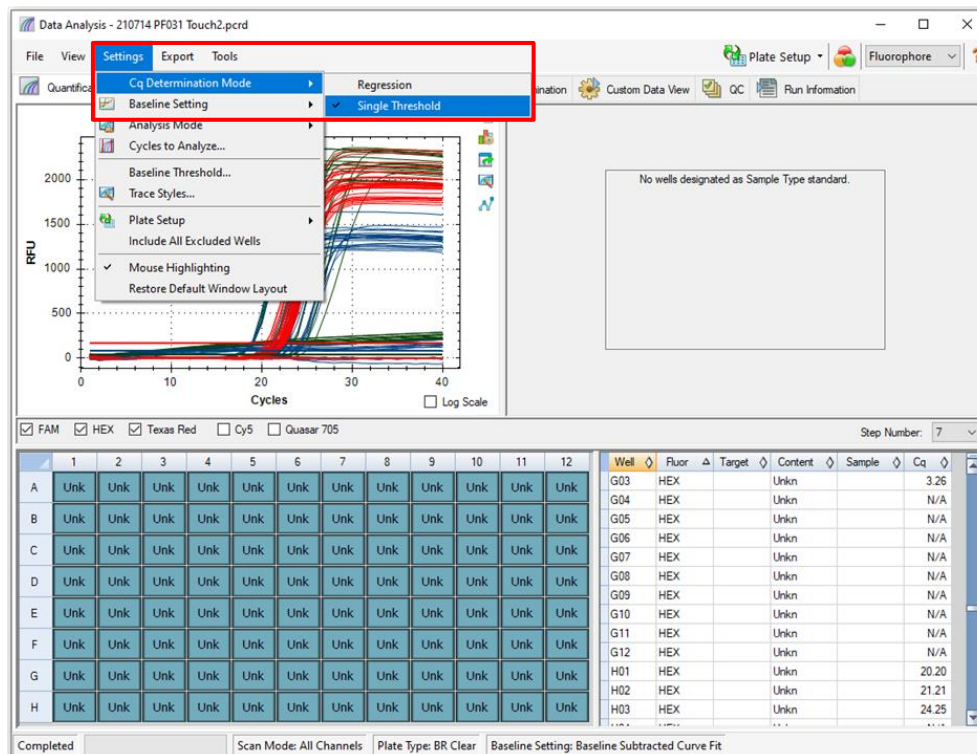
Gegevensinterpretatie kan worden uitgevoerd met de ingebouwde CFX-software door de onderstaande gevalideerde parameters te gebruiken. Neem voor verdere ondersteuning contact op met [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Selecteer een run-bestand met de **SpeedX PlexPCR-cyclus**-parameters

Zorg ervoor dat er naast de kanalen die in **Tabel 25** worden vermeld, geen andere kanalen zijn geselecteerd.

Klik op **Settings** (instellingen) > **Cq Determination Mode** (Cq-bepalingsmodus) en selecteer **Single Threshold** (enkele drempel) (**Afbeelding 29**)

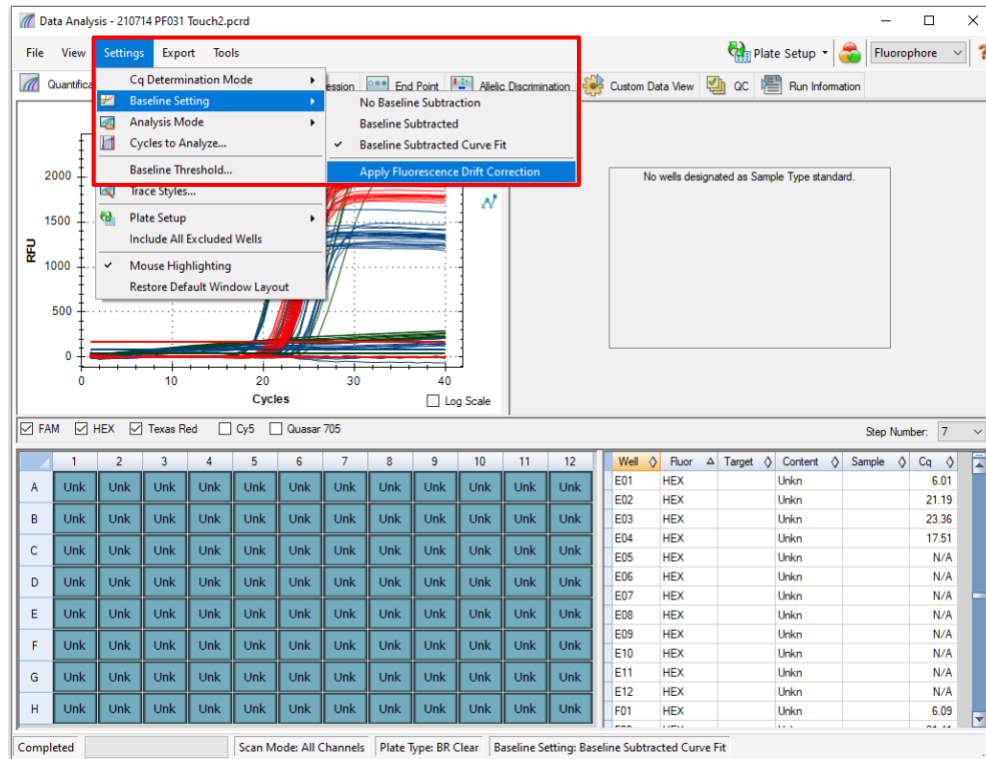
**Afbeelding 29. Instellingen Cq-bepalingsmodus**



Klik op **Settings** (instellingen) > **Baseline Setting** (baseline-instelling) en selecteer **Baseline Subtracted Curve Fit** (baseline afgetrokken curve-aanpassing) en schakel **Apply Fluorescence Drift Correction** (verloopcorrectie fluorescentie toepassen) in (**Afbeelding 30**)

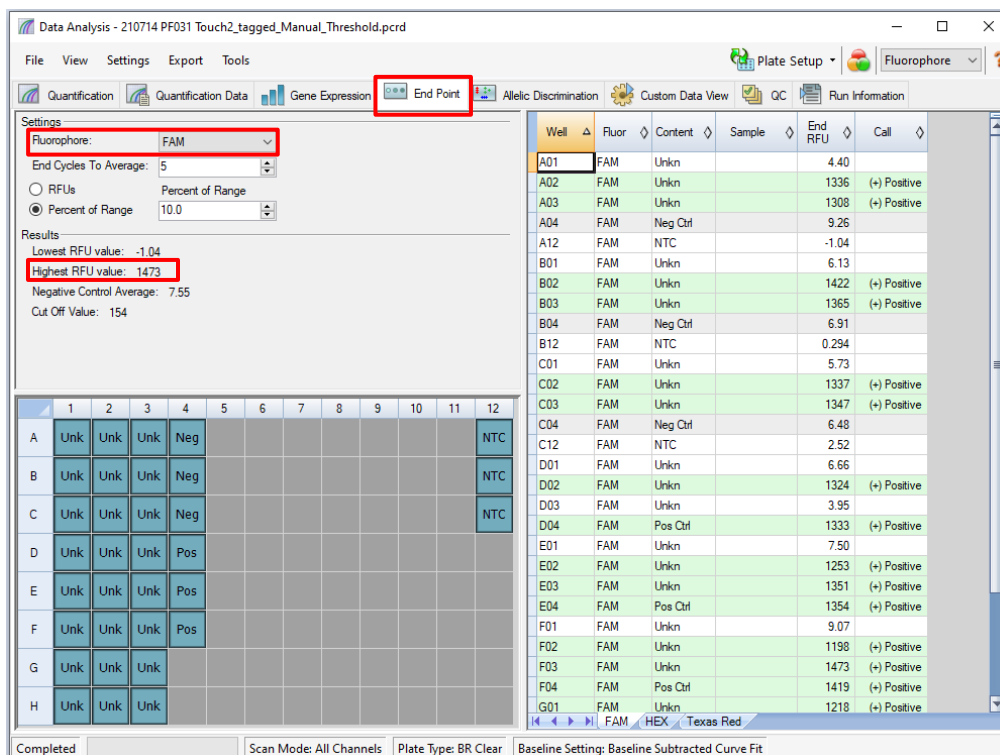


**Afbeelding 30. Baseline-instellingen**



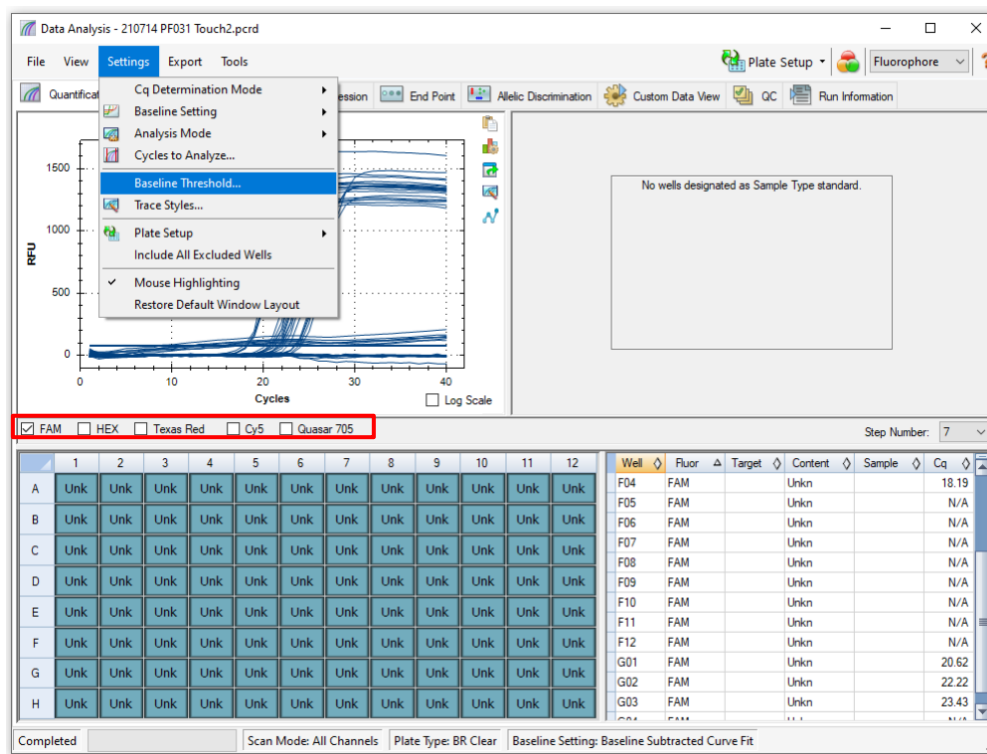
Selecteer het tabblad **End Point** (eindpunt) om de fluorescentiewaarden van het eindpunt te bekijken en selecteer de **FAM fluorophore** (FAM-fluorofloor) en noteer de **'Highest RFU value'** (hoogste RFU-waarde) (**Afbeelding 31**)

**Afbeelding 31. Noteer de 'Highest RFU value' (hoogste RFU-waarde)**

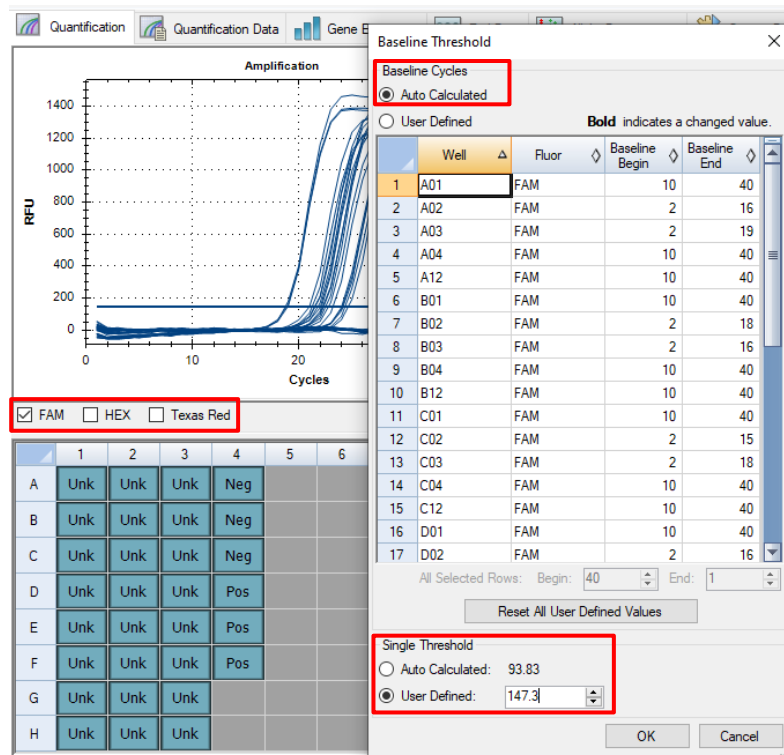


Ga terug naar het tabblad **Quantification** (kwantificering) en maak de selectie van de **HEX-** en **Texas Red**-fluoroforen ongedaan. Selecteer vervolgens **Settings** (instellingen) > **Baseline Threshold** (baseline-drempel) (**Afbeelding 32**)

**Afbeelding 32. Controleer de baseline-drempel van elk kanaal**



Schakel voor alle wells **Baseline Cycles** (baseline-cycli) > **Auto Calculated** (automatisch berekend) in en zet **Single Threshold** (enkele drempel) op **User Defined** (door de gebruiker gedefinieerd) > wijzig de waarde in **10%** van de '**Highest RFU value**' (hoogste RFU-waarde) voor dat kanaal, zoals bepaald met **Afbeelding 31**. Deze stap moet worden uitgevoerd met één kanaal tegelijk geselecteerd (**Afbeelding 33**)

**Afbeelding 33. Instellingen van de baseline-drempel**


Herhaal de stappen van **Afbeelding 31** tot **Afbeelding 33** voor het **HEX-kanaal** en het **Texas Red-kanaal**. *Let er op dat deze stap moet worden uitgevoerd met één kanaal tegelijk geselecteerd*

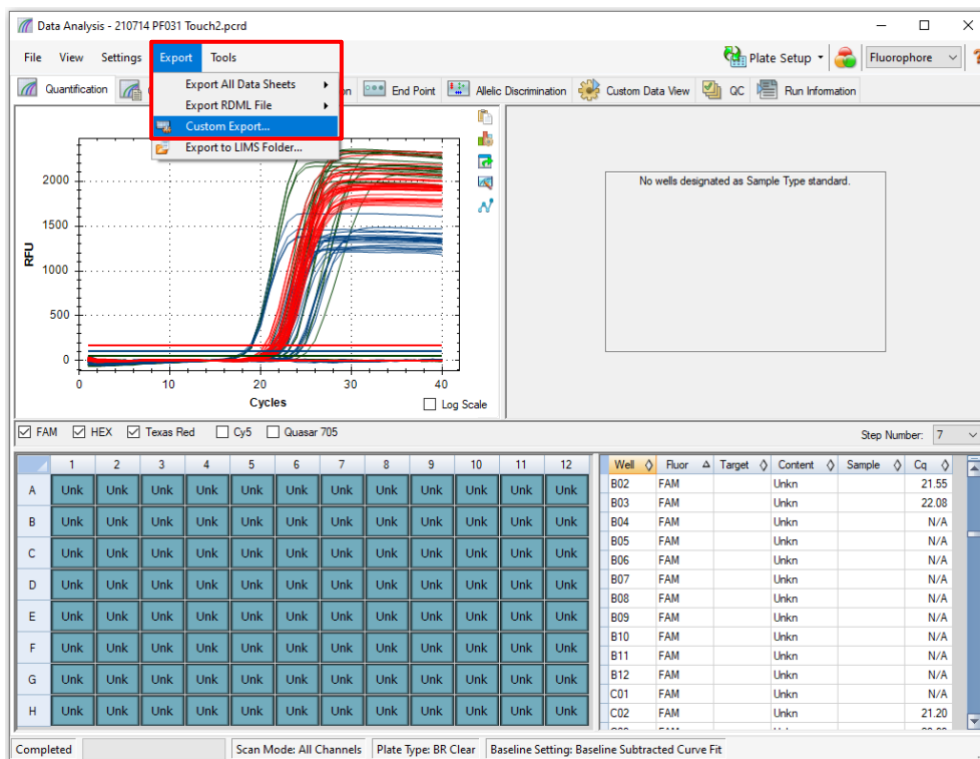
### 20.3 Resultaten van de ingebouwde analyse exporteren

Selecteer **Export** (exporteren) > **Custom Export** (aangepast exporteren) (**Afbeelding 34**)

Voor resultaten in een bestand met door komma's gescheiden waarden (.csv)

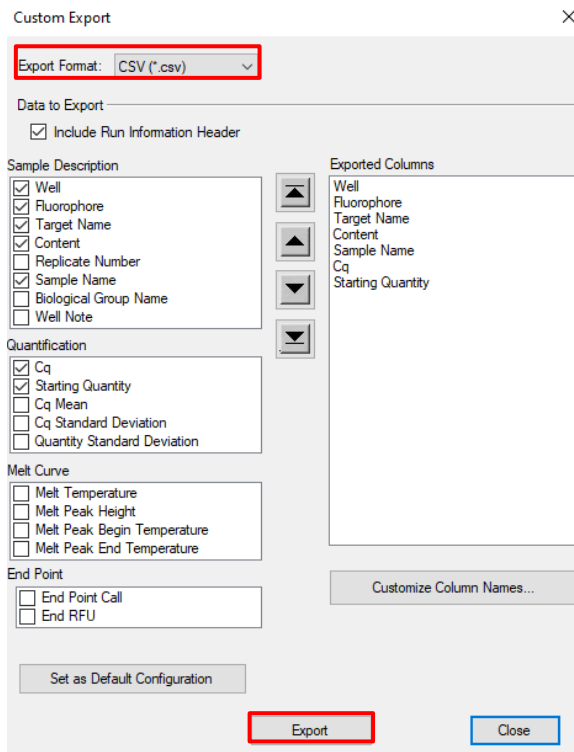
Voor resultaten in een door tabs gescheiden tekstbestand (.txt)

Afbeelding 34. Resultaten exporteren



Selecteer de gewenste exportindeling (bijv. .csv of .txt), kies de velden die u wilt exporteren en klik op **Export** (exporteren) (Afbeelding 35)

Afbeelding 35. Aangepaste exportinstellingen



The 'Custom Export' dialog box is shown. The 'Export Format' is set to 'CSV (\*.csv)'. The 'Data to Export' section has 'Include Run Information Header' checked. The 'Sample Description' section has 'Well', 'Fluorophore', 'Target Name', 'Content', 'Sample Name', and 'Biological Group Name' checked. The 'Quantification' section has 'Cq' and 'Starting Quantity' checked. The 'Melt Curve' section has 'Melt Temperature', 'Melt Peak Height', 'Melt Peak Begin Temperature', and 'Melt Peak End Temperature' unchecked. The 'End Point' section has 'End Point Call' and 'End RFU' unchecked. The 'Exported Columns' list contains 'Well', 'Fluorophore', 'Target Name', 'Content', 'Sample Name', 'Cq', and 'Starting Quantity'. The 'Export' button is highlighted with a red box.

#### 20.4 Interpretatie van de resultaten met de PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX)-analysesoftware

Gegevensinterpretatie kan worden uitgevoerd met de **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 (CFX)-analysesoftware. De analysesoftware is op aanvraag leverbaar. Neem voor meer informatie contact op via [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Zie **Bijlage A: Interpretatie van de resultaten** voor instructies over het gebruik van de **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 (CFX)-analysesoftware.

## 21 Bijlage A: Interpretatie van de resultaten

Voor interpretatie van de gegevens is de **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2-analysesoftware nodig. De SARS-CoV-2-analysesoftware automatiseert de gegevensinterpretatie van de amplificatieresultaten en stroomlijnt de workflow.

Zie voor verdere gedetailleerde aanwijzingen over het **FastFinder**-platform de **FastFinder-gebruiksaanwijzing** toegankelijk in het menu **Help**.

Zie **Tabel 27** voor de juiste analysesoftware voor elk instrument voor realtime PCR. De analysesoftware is op aanvraag leverbaar. Neem voor meer informatie contact op via [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Tabel 27. <i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2-analysesoftware		
Catalogusnr.	Analysesoftware*	Instrument voor realtime PCR
99021	<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (LC480)	LC480 II
99022	<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (CFX)	CFX96 Dx en CFX96 Touch

\* Raadpleeg de website <https://plexpcr.com/products/respiratory-infections/plexpcr-sars-cov-2/> om na te gaan of u de nieuwste versie van de analysesoftware gebruikt.

**NB:** Voor de overdracht, rapportage en opslag van resultaten moeten standaard laboratoriumpraktijken worden gevolgd om verlies van monsterinformatie te voorkomen.

### 21.1 FastFinder-platform – Minimale IT-vereisten

De analysesoftware is beschikbaar binnen de FastFinder-platforms (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>). De minimale IT-vereisten voor installatie van het FastFinder-platform worden hieronder opgenoemd.

#### Hardware-vereisten

PC (Mac-computers worden niet ondersteund)

Processor: 2 GHz, 2 GB RAM

Schijfruimte: 10 GB

Internetverbinding Kabel of DSL, proxy niet ondersteund

Min. schermresolutie: 1366 x 768 pixels

#### Ondersteund klantbesturingssysteem

Besturingssysteem Ondersteunde edities

Windows 10 32-bit en 64-bit

Windows 8.1 32-bit, 64-bit en ARM

Windows 8 32-bit, 64-bit en ARM

Windows 7 SP1 32-bit en 64-bit

Windows Vista SP2 32-bit en 64-bit

#### Ondersteunde browsers

Gebruikers van FastFinder-beheeraccount moeten voldoen aan een van de volgende:

- Internet Explorer 11 of later
- Microsoft Edge 25 of later
- Firefox 45 of later
- Google Chrome 47 of later.

Het kan werken op oudere versies, maar die worden niet officieel ondersteund.

## Software-vereisten

Om de FastFinder-software te gebruiken, is minimaal .NET 4.6.1 nodig. Zie voor meer informatie over het .NET raamwerk de hulppagina's van Microsoft Windows.

## Antivirus-instellingen

Uw antivirus-software kan het FastFinder-installatieprogramma (Ugentec.FastFinder.Installer.exe) in quarantaine plaatsen. Voeg dit bestand toe aan de antivirus-whitelist Voorbeeld: Symantic (Risico: WS.Reputatie.1)

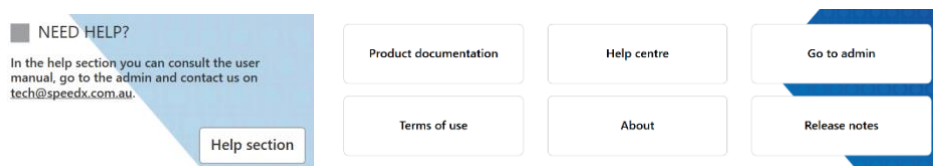
## Firewall-vereisten

https-verbindingen moeten worden toegestaan met \*.fastfinderplatform.com:443

Zie voor verdere gedetailleerde aanwijzingen over het **FastFinder**-platform de **FastFinder-gebruiksaanwijzing** toegankelijk in het **Help**-menu.

Het Help-menu wordt als volgt geopend:

- Open het startmenu 
- Selecteer  of de **Helpsectie** en selecteer vervolgens **Productdocumentatie** gevolgd door **Gebruiksaanwijzing**



## 21.2 Device set up (instellingen apparaat) (nieuwe gebruiker of nieuw apparaat)

Zie de **FastFinder Instructions For Use** (FastFinder-gebruiksaanwijzing) voor gedetailleerde instructies voor het instellen van het apparaat, toegankelijk via het menu **Help**


Open **FastFinder**

- Selecteer **Devices** (apparaten) op de workflowbalk
  - > Selecteer **Add** (toevoegen)
  - > Selecteer een bestand (uitvoeringsbestand) voor het nieuwe apparaat
- Wijzigen van de **Current directory** (huidige directory)
  - > Selecteer **Browse** (bladeren) en selecteer de map met de betreffende bestanden
  - > Selecteer **Next** (volgende)
- Toevoegen van informatie over het apparaat
  - > Selecteer **Save** (opslaan)

### 21.2.1 Colour Compensation (Kleurcompensatie)

**NB:** Zie **paragraaf 19.3** voor meer informatie over Colour Compensation (Kleurcompensatie)


Voor **LC480 II**-apparaten moet aan het apparaat een kleurcompensatiebestand worden toegevoegd

- Selecteer het LC480 II-apparaat
  - > In het gedeelte **Colour Compensation** (kleurcompensatie) selecteer 
  - > Selecteer het kleurcompensatiebestand voor het apparaat in de directory
- Om de Current directory (huidige directory) te wijzigen
  - > Selecteer **Browse** (bladeren) en selecteer de map met de betreffende bestanden

- Selecteer **Next** (volgende)
- Selecteer **PlexPCR SARS-CoV-2 (LC480)** in de lijst om een koppeling naar deze assay te maken
- Selecteer **Save** (opslaan)

Wanneer nodig kunnen nieuwe of aanvullende kleurcompensatiebestanden aan een apparaat worden toegevoegd of worden gedeactiveerd.

In het kleurcompensatiegedeelte van het apparaat

- Selecteer naast de bestandsnaam 
- Selecteer  om een kleurcompensatiebestand voor een assay te activeren of te deactiveren
- Selecteer **Save** (opslaan)



### 21.3 Plug-in voor assays (nieuwe gebruiker)

Zie de **gebruiksaanwijzing van FastFinder** voor gedetailleerde instructies voor het instellen van assays, toegankelijk via het menu **Help**

Open **FastFinder**

- Selecteer **Assays** op de workflowbalk
- Selecteer **Add** (toevoegen)
  - > Voor LC480 II > Selecteer **PlexPCR SARS-CoV-2 (LC480)** in de lijst
  - > Voor CFX96 Dx en CFX96 Touch > selecteer **PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX)** in de lijst
- Selecteer **Add** (toevoegen)


Om versies van het plug-in voor assays activeren of deactiveren

- In **General assay information** (algemene assay-informatie)
  - > Selecteer  **Versions** (versies)
  - > Selecteer  om de versie van de assay te activeren of deactiveren
  - > Selecteer **Save** (opslaan)



### 21.4 Monsternaamgeving

Er kunnen monsternaamtags worden toegewezen aan een plug-in voor assays ter automatisering van de detectie van wells en monstertypen voor analyse.

Selecteer **Assays** op de workflowbalk

- In het soort monster naamtags (voorvoegsel), selecteer 
  - > Selecteer  om een naamtag toe te voegen om het soort monsternaamtag te definiëren (Negative control (negatieve controle), Positive control/s (positieve controle/s) en Regular sample (normaal monster))
  - > Voeg het gewenste woord, acroniem of letter toe aan het tekstvak
  - > Selecteer **Save** (opslaan)





- Selecteer in Nametags voor mixdefinitie (achtervoegsel) 
  - > Selecteer  om een nametag toe te voegen om de mixnaam te definiëren
  - > Voeg het gewenste woord, acroniem of letter toe aan het tekstvak
  - > Selecteer **Save** (opslaan)
  
- Wijs in de instrumentsoftware (vóór of na voltooiing van de run) dezelfde naamtag toe aan de desbetreffende wells
  - > Voor **LC480 II** zie **paragraaf 19** voor instructies betreffende het programmeren van monsternaamtags in het run-bestand
  - > Voor **CFX96 Dx** en **CFX96 Touch** zie **paragraaf 20** voor instructies betreffende het programmeren van monsternaamtags in het run-bestand

**NB:** De naamtags van monsters zijn hoofdlettergevoelig. De naamtag moet exact overeenkomen met de toegewezen namen in het run-bestand.

### 21.5 Mixpartijnummers toevoegen

Er kunnen mixpartijnummers worden toegewezen aan de assay om reagentia traceerbaar te maken

- Selecteer **Assays** op de workflowbalk
  - > In de **Assay Lot** (partij): selecteer  om een nieuwe partij toe te voegen of selecteer  om een bestaande partij te bewerken
  - > Eenmaal toegevoegd komen partijnummers beschikbaar in de analysemodule.

Selecteer  Show all lots  Show only active lots om alle partijnummers of alleen actieve partijnummers weer te geven

### 21.6 Analyse

Selecteer **Analyses** op de workflowbalk om met een nieuwe analyse te beginnen

#### 1 Select datafile

Zoek het bestand dat ter analyse moet worden geüpload op in een bepaalde directory

- om de **Current directory** (huidige directory) wijzigen
  - > Selecteer **Browse** (bladeren) en selecteer de map met de betreffende bestanden
- Selecteer het run-bestand (gegevensbestand) uit de lijst
  - > Selecteer **Next step** (volgende stap)

#### 2 Assign assay(s)


Wijs de assay-informatie handmatig toe aan de plaat als er geen namen van monsters in de **Assays**-module zijn ingesteld.

- Voor **LC48 II** > selecteer **PlexPCR SARS-CoV-2 (LC480)**
- Voor **CFX96 Dx** en **CFX96 Touch** > selecteer **PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX)**
- Selecteer wells en wijs ze als volgt toe:
  - > Regulier monster (S)
  - > Negatieve controle (N)
  - > Positieve controle (P)
- Selecteer **Next step** (volgende stap)

Om de plaatindeling op te slaan als sjabloon voor toekomstig gebruik

- Selecteer wells en wijs monstertypen toe
  - > Selecteer  om het sjabloon op te slaan
- Specificeer sjabloonnaam voor toekomstig gebruik
  - > Selecteer **Save** (opslaan)

Om een eerder opgeslagen plaatsjabloon laden

- Selecteer  om het plaatsjabloon te laden
  - > Selecteer de sjabloon in het vervolgkeuzemenu
  - > Schakel het vakje in om in de plaatsjabloon gespecificeerde monstertypen te laden
  - > Selecteer **Load** (laden)

### 3 Configure assay(s)

- Voor **LC480 II** > selecteer **PlexPCR SARS-CoV-2 (LC480)**
  - > Selecteer **Assay Lot** (partij) in het vervolgkeuzemenu
  - > Selecteer **Analyse** (analyseren)
- Voor **CFX96 Dx** en **CFX96 Touch** > selecteer **PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX)**
  - > Selecteer **Assay Lot** (partij) in het vervolgkeuzemenu
  - > Selecteer **Analyse** (analyseren)

## 21.7 Resultaten

Zie **Tabel 28** voor een overzicht van mogelijke gerapporteerde monsterresultaten.

**NB:** Het wordt ten sterkste aanbevolen om amplificatiecurven te bevestigen voor alle positieve monsters.

Om de analyse af te ronden en verdere bewerkingen door de gebruiker te voorkomen

- > Selecteer **Authorise Analysis** (analyse autoriseren)
- > Selecteer **Yes** (ja) om te bevestigen
- Om de analyse af te wijzen of opnieuw te starten
  - > Selecteer **Restart Analysis** (analyse opnieuw opstarten) of **Reject Analysis** (analyse afwijzen)
  - > Selecteer een optie om te bevestigen

## 21.8 Referentiecurve

Een referentiecurve kan worden opgeslagen en gebruikt ter vergelijking van monsters op dezelfde plaat of op verschillende platen

- Selecteer het gewenste monster in het menu **Well Details** (Well-details) of **Target Details** (doeltdetails)
- In het amplificatiegrafiekmenu > selecteer 
  - > Schakel het selectievakje voor het betreffende kanaal in en voeg een label toe
  - > Selecteer **Save** (opslaan) om het signaal toe te voegen als een referentiecurve

Deze referentiecurve wordt nu in het **Assays**-menu gekoppeld aan de assay weergegeven en kan op elk gewenst moment worden gedeactiveerd.

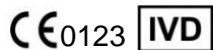
## 21.9 Overzicht van de resultaten

Tabel 28. Resultaatinterpretatie van de <i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2-analysesoftware (tabblad Resultatenoverzicht)					
Well	Naam	Assay	Resultaat	Cq-waarden	Algehele resultaten
A1	Monster 1_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positief	RdRp: 25,94 IC: 19,17	<b>Monster 1 – Positief</b> SARS-CoV-2 gedetecteerd.
A2	Monster 2_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Negatief	IC: 18,82	<b>Monster 2 – Negatief</b> SARS-CoV-2 niet gedetecteerd. IC geldig
A3	N_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Negatief	IC: 18,63	<b>N – Negatief</b> Negatieve controle geldig.
A4	Monster 3_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Ongeldig		<b>Monster 3 – Ongeldig</b> IC ongeldig. Monster opnieuw extraheren en opnieuw testen.
A5	Monster 4_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positief	ORF1ab: 22,75 RdRp: 23,48 IC: 18,79	<b>Monster 4 – Positief</b> SARS-CoV-2 gedetecteerd.
A6	Monster 5_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positief	ORF1ab: 22,75 RdRp: 23,48 IC: 18,79	<b>Monster 5 – Positief</b> SARS-CoV-2 gedetecteerd.
A7	N_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Ongeldig		<b>N – Ongeldig</b> Negatieve controle ongeldig.
A8	Monster 6_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positief	ORF1ab: 23,08 RdRp: 24,34 IC: 19,42	<b>Monster 6 – Positief</b> SARS-CoV-2 gedetecteerd.
A9	P_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positief	ORF1ab: 18,98 RdRp: 19,97 IC: 18,39	<b>P – Positief</b> Positieve controle geldig.
A10	P_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Ongeldig		<b>P – Ongeldig</b> Positieve controle ongeldig.
A11	Monster 7_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Ongeldig	IC: 18,83	<b>Monster 7_CoV – Ongeldig</b> Fout: abnormale wijziging in het fluorescentieniveau.
A12	Monster 8_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Ongeldig		<b>Monster 8_CoV – Ongeldig</b> <b>Monster is afgewezen</b>

### 21.10 Resultaten exporteren

- Exporteren van resultaten
  - > Selecteer **Exports** (exporten) op de workflowbalk
  - > Exporteer een of meer van de volgende soorten rapporten: **Cq values list (Cq-waardenlijst) (CSV)**, **Results (resultaten) (CSV)**, **Generic Amplification CSV (generieke amplificatie CSV)** of het juiste LIS-integratiebestand.
  - > Selecteer **Exports** (exporten)
- Downloaden van exporten
  - > Selecteer **Reports** (rapporten) op de workflowbalk
  - > Selecteer bestanden en sla op
- U kunt in plaats hiervan ook een aangepast rapport exporteren
  - > Exporteer **Amplification Curve Analysis (PDF)** (amplificatiecurveanalyse [PDF])
  - > Selecteer de informatie die u in het rapport wilt opnemen (grafieken, audit-trail, resultatenoverzicht)
  - > Selecteer de gewenste rapportinstellingen om de monstervolgorde aan te passen
- Selecteer **Exports** (exporten)
  - > Open het rapport in **Report Viewer** (rapportviewer) voor weergave, opslaan en afdrukken

## 22 Woordenlijst



Europese conformiteit  
Voor *in-vitro* diagnostiek



Catalogusnummer



Batchcode



Geautoriseerde vertegenwoordiger  
In de Europese Gemeenschap



Fabrikant



Aanmaakdatum



Temperatuurbepering



Bevat voldoende voor  
xxx bepalingen



Uiterste gebruiksdatum



Europese importeur



Verenigd Koninkrijk Markering  
voor conformiteitsbepaling

SpeedX-producten worden mogelijk beschermd door één of meer plaatselijke of buitenlandse octrooien. Zie [www.plexpcr.com/patents](http://www.plexpcr.com/patents) voor gedetailleerde informatie over het octrooi.

De handelsmerken **PlexPCR**<sup>®</sup>, **PlexZyme**<sup>®</sup> en **PlexPrep**<sup>™</sup> zijn eigendom van SpeedX. Overige auteursrechten en handelsmerken zijn het eigendom van de respectieve rechthebbende.

© Copyright 2023 SpeedX Pty. Ltd.